

OPPORTUNITIES FOR MANAGEMENT OF VIBRIO PATHOGENS IN AQUACULTURE

Aantal woorden: 16946

Thibaut Goeteyn

Stamnummer: 01503495

Promotoren: Prof. dr. ir. Nico Boon, Prof. dr. ir. Tom Defoirdt

Tutor: Ir. Jasmine Heyse

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de richting Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie

Academiejaar: 2019 - 2020



OPPORTUNITIES FOR MANAGEMENT OF VIBRIO PATHOGENS IN AQUACULTURE

Aantal woorden: 16946

Thibaut Goeteyn

Stamnummer: 01503495

Promotoren: Prof. dr. ir. Nico Boon, Prof. dr. ir. Tom Defoirdt

Tutor: Ir. Jasmine Heyse

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de richting Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie

Academiejaar: 2019 - 2020



Deze pagina is niet beschikbaar omdat ze persoonsgegevens bevat.
Universiteitsbibliotheek Gent, 2021.

This page is not available because it contains personal information.
Ghent University, Library, 2021.

Voorwoord

Nu de studententijd erop zit, kan ik aan een nieuwe periode in mijn leven beginnen, waarbij ik alle theoretische kennis kan omzetten in de praktijk. De laatste vijf jaren waren zwaar en vermoeiend, maar hebben mij enorm veel nieuwe dingen bijgeleerd. Hard werk wordt beloond en dat toont zich ook in het eindresultaat, maar dat zou niet mogelijk zijn zonder de hulp van enkele mensen, die ik ook graag wil bedanken.

Allereerst wil ik mijn bedanking uitspreken aan mijn promotoren Prof. dr. ir. Nico Boon en Prof. dr. ir. Tom Defoirdt. Bedankt voor de interessante en leuke meetings en voor de nieuwe inzichten en oplossingen waardoor mijn onderzoek bijgestuurd kon worden.

Ook zou ik graag mijn tutor Ir. Jasmine Heyse willen bedanken voor de vele hulp in het labo, de data-analyse in R en de hulp bij het schrijven van de thesis. Hiernaast wil ik graag CMET bedanken voor de kans die ik kreeg om mijn thesisonderzoek bij jullie uit te voeren en de steun die ik kreeg van iedereen.

Tot slot wil ik mijn vriendin Shelby bedanken voor de steun doorheen het jaar, voor mijn taalfouten in de thesis te verbeteren en omdat ik altijd op jou kon rekenen.

Effect van de coronacrisis op mijn masterthesis

De coronacrisis had in mindere mate een invloed op mijn masterthesis, doordat er reeds meerdere experimenten uitgevoerd waren. Maar het heeft er wel voor gezorgd dat nog enkele geplande experimenten van mijn masterthesis niet hebben kunnen doorgaan. Een eerste experiment dat gepland stond, had als doel meer inzicht te krijgen in waarom de GFP-expressie niet zo betrouwbaar was. Hierbij zou de halfwaardetijd van het GFP-eiwit bepaald worden. Hiertoe zou chlooramfenicol, een antibioticum dat de synthese van eiwitten blokkeert, toegevoegd worden aan een *V. campbellii* cultuur. Op basis van de afname in fluorescentie over de tijd zou de halfwaardetijd van het eiwit bepaald worden.

Een tweede experiment dat gepland stond om uit te voeren, was om verder onderzoek te doen naar de invloed van spatiale organisatie van de nutriënten. De invloed op het invasiepotentieel van verschillende types voeding (i.e. partikels van verschillende grootte ten opzichte van vloeibare voeding) zou nagegaan worden. De invader *V. campbellii* is motiel en kan biofilms vormen. Deze eigenschappen zouden ervoor kunnen zorgen dat *V. campbellii* de partikels en dus ook de nutriënten kan koloniseren. Dit experiment zou uitgevoerd worden met partikels van verschillende grootte en vloeibare nutriënten ter controle. Op die manier zou er niet enkel informatie verkregen worden over het verschil tussen partikels en vloeibaar medium, maar ook over het belang van de grootte van de partikels.

Deze preambule werd in overleg tussen de student en de promotor opgesteld en door beiden goedgekeurd.

Abstract

Aquacultuur is de snelst groeiende voedselproducerende sector ter wereld. De frequente uitbraken van ziektes vormen echter een grote bedreiging voor de verdere duurzame uitbreiding van de sector. *Vibrio* spp. zijn één van de belangrijkste bacteriële pathogenen die dergelijke ziektes veroorzaken. Antibiotica wordt veelvuldig gebruikt als een methode om deze bacteriële ziektes onder controle te houden, maar dit leidt tot de ontwikkeling van antibioticaresistentie. De nood aan alternatieve microbiële managementtechnieken is hoog. In deze masterthesis werd het invasiepotentieel van een model-invader, *Vibrio campbellii*, gekwantificeerd in relatie tot typische aquacultuurpraktijken zoals de frequente toediening van voeding.

In een eerste experiment werd het modelsysteem, waarbij de GFP-expressie van de invader gebruikt werd om de invasie in een microbiële gemeenschap te kwantificeren, gevalideerd. Daarbij werd vastgesteld dat de GFP-expressie niet stabiel en betrouwbaar is over de tijd en over de verschillende media. Het verlies van GFP-expressie is afhankelijk van de nutriëntenconcentratie die aanwezig is in het medium. De timing over de groeicurve van *V. campbellii* en de aanwezigheid van een autochtone microbiële gemeenschap had ook een negatieve invloed op de GFP-expressie.

Een tweede experiment werd uitgevoerd om de invloed van de timing van invasie na de toediening van nutriëntenpulsen te bepalen. De timing van invasie na toevoeging van een nutriëntenpuls aan de autochtone gemeenschap had een grote invloed op het invasiepotentieel van de invader. Hoe eerder de invader werd toegevoegd na de nutriëntenpuls, hoe sterker de invader uitgroeide in absolute en relatieve abundantie. Parallel naast dit experiment werd de invloed van de invader fysiologie bepaald. Hiertoe werd een invader die actief groeide net voor de invasie vergeleken met een invader die in stationaire fase was. Hier werd bevonden dat de fysiologie een grote invloed heeft op het invasiepotentieel. De invader die actief groeide op het moment van invasie bereikte steeds hogere absolute en relatieve abundanties in vergelijking met de stationaire invader.

Als laatste experiment werd onderzocht wat de invloed was van het herhaaldelijk toedienen van nutriëntenpulsen aan een autochtone gemeenschap voor de invasie. Hieruit kon geconcludeerd worden dat deze herhaaldelijke nutriëntenpulsen voor de invasie de gemeenschap meer resistent maakten tegen de invasie.

Dit onderzoek toont aan dat het toedienen van voeding en de timing ervan in relatie tot de timing van invasie een belangrijke rol kan spelen in het invasiesucces van pathogene bacteriën in de aquacultuur en geeft belangrijke inzichten voor de ontwikkeling van effectieve microbiële managementstrategieën.

Kernwoorden: Invasie, aquacultuur, microbiële gemeenschap, *Vibrio*, GFP-expressie

Abstract

Aquaculture is the fastest growing food producing sector in the world. However, the frequent outbreaks of diseases are a major threat to the further sustainable expansion of the sector. *Vibrio* spp. are one of the major bacterial pathogens that cause such diseases. Antibiotics are widely used as a method to control these bacterial diseases, but this leads to the development of antibiotic resistance. The need for alternative microbial management techniques is high. In this master thesis, the invasion potential of a model-invader, *Vibrio campbellii*, was quantified in relation to typical aquaculture practices such as frequent feeding.

In a first experiment the model system, using the invader's GFP-expression to quantify the invasion into a microbial community, was validated. From these experiments, it was concluded that the GFP-expression is not stable and reliable over time and across the different media. The loss of GFP-expression is dependent on the nutrient concentration present in the medium. The timing of the growth curve of *V. campbellii* and the presence of a native microbial community also negatively impacted the GFP-expression.

In a second experiment the influence of the timing of an invasion after the addition of a nutrient pulse was investigated. The timing had a significant impact on the invasion potential. The earlier the invader was added after the nutrient pulse, the higher the absolute and relative abundances were reached in the resident community. In parallel to this experiment, the influence of the invader physiology was determined. Hereby an invader that was actively growing just before the invasion was compared to an invader that was in a stationary phase. Here it was found that physiology has a major influence on the invasion potential. The invader that was actively growing at the time of invasion reached higher absolute and relative abundances compared to the stationary invader.

As a last experiment, the influence of the repeated addition of nutrient pulses to a native community before the invasion was investigated. From this it could be concluded that repeated nutrient pulses before the invasion event made the community more resistant to the invasion.

This research demonstrates that addition of feed and its timing relative to the timing of the invasion can play an important role in the invasion success of pathogenic bacteria in aquaculture, and therefore provides important insights for the development of effective microbial management strategies.

Keywords: Invasion, aquaculture, microbial community, *Vibrio*, GFP-expression

Inhoudsopgave

1	LITERATUURSTUDIE	1
1.1	AQUACULTUURZIEKTES VEROORZAAKT DOOR <i>VIBRIO</i> SPP.	1
1.1.1	Virulentie factoren van <i>Vibrio</i> spp.	2
1.1.2	Quorum sensing	3
1.2	MICROBIEEL MANAGEMENT IN AQUACULTUUR	4
1.2.1	Vaccinaties	4
1.2.2	Pre-, pro- en synbiotics	6
1.2.3	Biofloc technologie	7
1.2.4	Green water technologie	7
1.2.5	r/K selectie strategie	8
1.3	MICROBIËLE INVASIE	10
1.3.1	De vier stappen van invasie	10
1.3.2	Factoren die invasie beïnvloeden	11
1.4	DOELSTELLINGEN	15
2	MATERIAAL EN METHODEN	17
2.1	TECHNIEKEN	17
2.1.1	Bacteriële stam	17
2.1.2	Microbiële analyse	17
2.2	EXPERIMENTELE SETUPS	19
2.2.1	Experiment 1: GFP-betrouwbaarheid	19
2.2.2	Experiment 2: Invasie na nutriëntenpulsen en het belang van invader fysiologie	22
2.2.3	Experiment 3: Invasie na herhaaldelijke nutriëntenpulsen	24
3	RESULTATEN	27
3.1	EXPERIMENT 1: VALIDATIE VAN HET MODELSYSTEEM	27
3.1.1	GFP-betrouwbaarheid over de tijd	27
3.1.2	GFP-betrouwbaarheid over de groeicurve van <i>V. campbellii</i> LMG 21363	28
3.1.3	GFP-betrouwbaarheid wanneer <i>V. campbellii</i> LMG 21363 interageert met een gemende gemeenschap	30
3.2	EXPERIMENT 2: INVASIE NA NUTRIËNTENPULSEN	31
3.2.1	Belang van de timing van introductie van een invader na een nutriëntenpuls	31
3.2.2	Belang van invader fysiologie	32
3.3	EXPERIMENT 3: INVASIE NA HERHAALDELIJKE NUTRIËNTENPULSEN	35
3.3.1	Invloed van herhaaldelijke nutriëntenpulsen op het invasiepotentieel	36
3.3.2	Invloed van herhaaldelijke nutriëntenpulsen op de verblijftijd van de invader <i>V. campbellii</i> in de microbiële gemeenschap	39
4	ALGEMENE DISCUSSIE	42
4.1	INVASIE STUDIES MET FLUORESCENTE PROTEÏNEN	42
4.1.1	Bespreking van de resultaten	42

4.1.2	Alternatieven voor invasie op te volgen.....	43
4.2	INVASIE-EXPERIMENTEN NA NUTRIËNTENPULSEN.....	45
4.2.1	Invloed van de timing van invasie.....	45
4.2.2	Invloed van de invader fysiologie.....	47
4.2.3	Invloed van herhaaldelijke nutriëntenpulsen op het invasiepotentieel.....	48
4.2.4	Invloed van herhaaldelijke nutriëntenpulsen op de verblijftijd van <i>V. campbellii</i> in de microbiële gemeenschap.....	49
4.3	TOEKOMST PERSPECTIEVEN	50
5	BESLUIT.....	51
6	BIBLIOGRAFIE	52
7	BIJLAGEN	63
7.1	EXPERIMENT 1: VALIDATIE VAN HET MODELSYSTEEM	63
7.1.1	GFP-betrouwbaarheid over de tijd	63
7.1.2	GFP-betrouwbaarheid over de groeicurve van <i>V. campbellii</i> LMG 21363.....	64
7.1.3	GFP-betrouwbaarheid wanneer <i>V. campbellii</i> LMG 21363 interageert met een gemende gemeenschap.....	66
7.2	EXPERIMENT 2: INVASIE NA NUTRIËNTENPULSEN.....	67
7.3	EXPERIMENT 3: INVASIE NA HERHAALDELIJKE NUTRIËNTENPULSEN.....	70

Lijst met afkortingen

<i>Afkorting</i>	<i>Anderstalige betekenis</i>	<i>Nederlandse betekenis</i>
AHPND	Acute hepatopancreatic necrosis disease	Acuut hepatopancreatisch necroseziekte
AHL	Acylated homoserine lactones	Geacyleerde homoserine lactonen
EMS	Early mortality syndrome	Vroeg mortaliteitssyndroom
GFP	Green fluorescent protein	Groen fluorescent proteïne
OD	Optical density	Optische densiteit
TCBS	Thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose	Thiosulfaat-citraat-galzouten-sucrose
VBNC	Viable but not culturable	Levend maar niet kweekbaar

Lijst met figuren

FIGUUR 1: JAARLIJKE GARNALENPRODUCTIE IN THAILAND VAN 1978 TOT 2014, MET AANDUIDING VAN DE UITBRAAK VAN DE BELANGRIJKSTE ZIEKTES (YHV: YELLOW HEAD VIRUS, WSSV: WHITE SPOT SYNDROME VIRUS, MSGS: MONODON SLOW GROWTH SYNDROME, EMS: EARLY MORTALITY SYNDROME, AHPND: ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE) (MOHAMED ET AL., 2016).....	VII
FIGUUR 2: QUORUM SENSING IN <i>V. HARVEYI</i> . (A) DE AUTO-INDUCERS ZIJN AFWEZIG, WAARDOOR LUXO WORDT GEFOSFORYLEERD, WAT OP ZIJN BEURT ERVOOR ZORGT DAT HET LUX _{R_{VH}} -EIWIT NIET GEPRODUCEERD WORDT. (B) BIJ EEN HOGE CONCENTRATIE VAN DE AUTOINDUCERS WORDT LUXO GEDEFOSFORYLEERD, WAT UITEINDELIJK LEIDT TOT DE VORMING VAN HET LUX _{R_{VH}} -EIWIT (DEFOIRD ET AL., 2008).....	4
FIGUUR 3: HET GEBRUIK VAN ANTIBIOTICA EN DE GROEI VAN DE VISPRODUCTIE VAN DE NOORSE AQUACULTUURINDUSTRIE VAN 1986 TOT 2003 (SOMMERSET ET AL., 2005).	5
FIGUUR 4: TWEE VOORBEELDEN VAN HOE DE HUIDIGE AQUACULTUURPRAKTIJEN DE R-SELECTIE GAAN BEVORDEREN, WAT DE KANS OP PATHOGEENINVASIE EN SCHADELIJKE INFECTIES VERHOOGT (DE SCHRYVER & VADSTEIN, 2014).	9
FIGUUR 5: HET PROCES VAN EEN MICROBIËLE INVASIE (MALLON ET AL., 2015). (A) INTRODUCTIE; (B) VESTIGING; (C) GROEI EN VERSPREIDING; (D) IMPACT.	10
FIGUUR 6: DE WISSELWERKING TUSSEN DE BIOLOGISCHE DIVERSITEIT EN NUTRIËNTENBESCHIKBAARHEID VOOR HET BEPALEN VAN DE INVASIERESISTENTIE (MALLON ET AL., 2015). HET BOVENSTE, LICHTGRIJZE GEBIED TOONT DE GEMEENSCHAPPEN MET TOENEMENDE SOORTRIJKHEID EN SOORTGELIJKHEID (TOT BLOK C) EN MET VERGELIJKBARE CELABUNDANTIE. HET ONDERSTE, DONKERGRIJZE GEBIED GEEFT HET TOTAAL AANTAL NUTRIËNTEN WEER DAT BESCHIKBAAR IS VOOR DE GEMEENSCHAP (ZWART) EN HET AANTAL DAT DAADWERKELIJK WORDT VERBRUIKT (WIT).	13
FIGUUR 7: SCHEMATISCHE REPRESENTATIE VAN DE INVLOED VAN NUTRIËNTENDISTRIBUTIE OP DE MOGELIJKHEDEN VOOR EEN OPPORTUNISTISCH PATHOGEEN OM EEN AUTOCHTONE MICROBIËLE GEMEENSCHAP TE INVADEREN IN EEN AQUACULTUURSYSTEEM (DEFOIRD, 2016). HOE DONKERDER DE KLEUR, HOE HOGER DE NUTRIËNTENCONCENTRATIE. (A) DE NUTRIËNTEN ZIJN HOMOGEEN VERDEELD, WAARDOOR DE K-STRATEGEN DE NUTRIËNTEN KUNNEN GEBRUIKEN EN DE POPULATIEGROOTTE VAN DE PATHOGEEN NIET KAN STIJGEN. (B) DE NUTRIËNTEN ZIJN NIET HOMOGEEN VERDEELD (ZOALS IN DE PRAKTIJK), WAARDOOR DE MOTIELE PATHOGENEN DE NUTRIËNTEN KUNNEN EXPLOITEREN. (C) NAAST DE GEÏNVADEERDE, OPPORTUNISTISCHE PATHOGEEN EN DE K-STRATEGEN BEVAT DE MICROBIËLE GEMEENSCHAP OOK R-STRATEGEN, WAARDOOR HET IN COMPETITIE KAN GAAN VOOR NUTRIËNTEN MET DE PATHOGEEN. (D) INDIEN VOEDERKORRELS WORDEN GEBRUIKT DIE SNEL UITEENVALLLEN, ZULLEN ZE ZICH SNEL VERSPREIDEN, WAARDOOR DE MOGELIJKHEID WAARIN OPPORTUNISTISCHE PATHOGENEN DE HOTSPOTS KUNNEN GEBRUIKEN VEEL KLEINER WORDT.	14
FIGUUR 8: HET PRINCIPE VAN FLOW CYTOMETRISCHE BEPALING VAN DE TOTALE CELCONCENTRATIE, INTACTE CELCONCENTRATIE EN HET AANTAL GFP-POSITIEVE CELLEN. DE TOTALE CELCONCENTRATIE BEPALING IS GEBASEERD OP SYBR GREEN I DIE ALLE BACTERIËLE CELLEN MET NUCLÉINEZUREN BINNENDRINGT EN KLEURT ONAFHANKELIJK VAN DE MEMBRAANINTEGRITEIT. DE INTACTE CELCONCENTRATIE BEPALING IS GEBASEERD OP EEN DUBBELE KLEURING MET ZOWEL SYBR GREEN I ALS PROPIDIUM JODIDE, WAARBIJ PROPIDIUM JODIDE ALLEEN BACTERIËLE CELLEN MET BESCHADIGDE CELMEMBRANEN KAN BINNENDRINGEN EN KLEUREN. HIERDOOR KAN ER ONDERSCHIED GEMAAKT WORDEN TUSSEN BACTERIËLE CELLEN MET INTACTE MEMBRANEN (MET SYBR GREEN GEKLEURD) EN BESCHADIGDE (MET SYBR GREEN EN PROPIDIUM JODIDE GEKLEURD) BACTERIËLE CELLEN. OM DE ABUNDANTIE VAN GFP-POSITIEVE CELLEN EN DUS <i>V. CAMPBELLII</i> TE BEPALEN WORDT GEBRUIK GEMAAKT VAN ZIJN GFP-EXPRESSIE. HIERBIJ MOET HET STAAL NIET GEKLEURD WORDEN. HET AANTAL GFP-POSITIEVE CELLEN IS HET AANTAL CELLEN VAN DE INVADER (HERWERKT UIT VAN NEVEL ET AL., 2017).	18

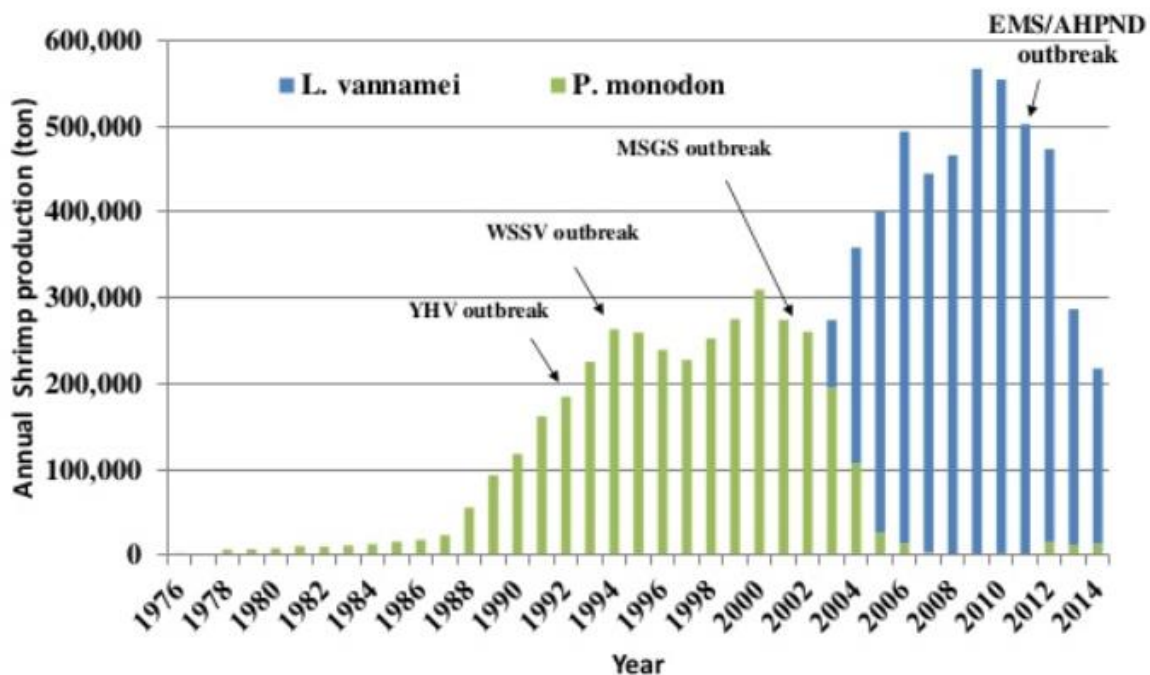
FIGUUR 9: VOORBEELD VAN EEN FLOW CYTOMETRISCHE PLOT MET HANDMATIG GEKOZEN GATES. GATING WERD IN DIT VOORBEELD TOEGEPAST OM DE INTACTE CELLEN, DE BESCHADIGDE CELLEN EN DE ACHTERGROND VAN ELKAAR TE ONDERSCHIEDEN (HAMMES & EGLI, 2010).	19
FIGUUR 10: PRELIMINAIRE GROEICURVEN VAN <i>V. CAMPBELLII</i> IN DE DRIE VERSCHILLENDE MEDIA EN IN AAN- EN AFWEZIGHEID VAN KANAMYCINE. DE GROENE DRIEHOEKEN DUIDEN DE VIER GEKOZEN TIJDSPUNTEN AAN WAAROP TIJDENS HET EXPERIMENT STALEN VOOR FLOW CYTOMETRIE GENOMEN WERDEN EN STEMDEN OVEREEN MET DE LAG FASE, DE EXPONENTIËLE FASE, DE VROEGE STATIONAIRE FASE EN DE STATIONAIRE FASE. DE VERTICALE LIJN GEEFT WEER WANNEER ALLE CULTUREN ZICH IN STATIONAIRE FASE BEVONDEN (T = 11.5H). ER WAREN BIOLOGISCHE REPLICATEN VOOR ELKE CONDITIE (N = 10).....	21
FIGUUR 11: CO-CULTUUR OPSTELLING WAARBIJ <i>V. CAMPBELLII</i> LMG 21363 WERD TOEGEVOEGD IN HET APICALE COMPARTIMENT EN DE GEMENGDE GEMEENSCHAP IN HET BASALE COMPARTIMENT.....	22
FIGUUR 12: VISUALISATIE VAN DE OPZET VAN EXPERIMENT 2, WAARBIJ DE VIER VERSCHILLENDE CONDITIES WORDEN GETOOND. ALLE GEMEENSCHAPPEN ONTVINGEN EEN NUTRIËNTENPULS OP T1 EN ER WERD STEEDS OP EEN ANDER TIJDSTIP GEÏNVADEERD EN DIT DOOR ZOWEL EEN INVADER DIE OOK EEN NUTRIËNTENPULS ONTVANGEN HAD, ALS DOOR EEN INVADER DIE IN STATIONAIRE FASE WAS. MET UITZONDERING BIJ TIJDSTIP T1 WAARBIJ ENKEL INVASIE MET DE STATIONAIRE INVADER WERD UITGEVOERD. DE GEKOZEN TIJDSTIPPEN ZIJN OP BASIS VAN DE PRELIMINAIRE GROEICURVEN VAN DE GEMENGDE GEMEENSCHAP EN <i>V. CAMPBELLII</i> LMG 21363 (EXTRA FIGUUR 7 EN EXTRA FIGUUR 8) (T1 = 0H, T2 = 3H, T3 = 8H, T4 = 12H, T5 = 24H, T6 = 36H, T7 = 48H).	23
FIGUUR 13: DE VIJF GETESTE CONDITIES, DIE ELK EEN ANDERE COMBINATIE HEBBEN VAN INVASIE TIMING EN NUTRIËNTENPULSFREQUENTIE. CONDITIE A, B, C EN D WERDEN MET ELKAAR VERGELEKEN OM NA TE GAAN OF DE GEMEENSCHAP MEER OF MINDER INVASIERESISTENT WAS NA HET VERKRIJGEN VAN HERHAALDELIJKE NUTRIËNTENPULSEN VOOR DE INVASIE. CONDITIE A EN E WERDEN MET ELKAAR VERGELEKEN OM NA TE GAAN OF HERHAALDELIJKE NUTRIËNTENPULSEN NA DE INVASIE DE AANWEZIGHEID VAN <i>V. CAMPBELLII</i> IN DE AUTOCHTONE GEMEENSCHAP KON VERLENGEN.	25
FIGUUR 14: HET PERCENTAGE VAN GFP-POSITIEVE CELLEN IN FUNCTIE VAN DE TIJD, IN DE AAN- EN AFWEZIGHEID VAN KANAMYCINE, ONDER DE VERSCHILLENDE NUTRIËNTENCONDITIES. ER WAREN BIOLOGISCHE REPLICATEN VOOR ELKE CONDITIE (N = 3). DE LIJNEN GEVEN DE GEMIDDELDE TREND VAN DE REPLICATEN AAN.	27
FIGUUR 15: DE TOTALE CELDENSITEIT (A) EN HET PERCENTAGE GFP-POSITIEVE CELLEN (B) IN FUNCTIE VAN DE TIJD, IN DE AAN- EN AFWEZIGHEID VAN KANAMYCINE, ONDER DE VERSCHILLENDE NUTRIËNTENCONDITIES. DE GEMETEN PUNTEN WERDEN ZO GEKOZEN DAT HET DE GROEIFASEN VAN <i>V. CAMPBELLII</i> LMG 21363 OMVATTE. ER WAREN BIOLOGISCHE REPLICATEN VOOR ELKE CONDITIE (N = 3). DE LIJNEN GEVEN DE GEMIDDELDE TREND VAN DE REPLICATEN AAN.	29
FIGUUR 16: HET PERCENTAGE GFP-POSITIEVE CELLEN IN FUNCTIE VAN DE TIJD EN ONDERVERDEELD OVER DE VERSCHILLENDE GETESTE CONDITIES. ER WAREN DUPLICATEN VOOR ELKE CONDITIE (N = 2).	30
FIGUUR 17: ABSOLUTE INVADER ABUNDANTIE OVER DE TIJD BIJ VIER VERSCHILLENDE INVASIETIJDSPUNTEN (T1 = 0H, T2 = 3H, T3 = 8H, T4 = 12H NA DE INITIËLE NUTRIËNTENPULS). ER WAREN TECHNISCHE (N = 3) EN BIOLOGISCHE (N = 3) REPLICATEN PER CONDITIE. DE RODE PIJLEN DUIDEN DE TIMING VAN INVASIE AAN.	31
FIGUUR 18: ABSOLUTE INVADER ABUNDANTIE VAN DE STATIONAIRE INVADER EN DE INVADER MET NUTRIËNTENPULS OVER DE TIJD BIJ VIER VERSCHILLENDE INVASIETIJDSPUNTEN (T1 = 0H, T2 = 3H, T3 = 8H, T4 = 12H NA DE INITIËLE NUTRIËNTENPULS). ER WAREN TECHNISCHE (N = 3) EN BIOLOGISCHE (N = 3) REPLICATEN PER CONDITIE. DE RODE PIJLEN DUIDEN DE TIMING VAN INVASIE AAN.	32
FIGUUR 19: DE TOTALE CELDENSITEITEN VAN DE GEMEENSCHAPPEN MET DE TWEE VERSCHILLENDE INVADERS (I.E. MET NUTRIËNTENPULS EN DE STATIONAIRE INVADER) EN DE AUTOCHTONE GEMEENSCHAP (ZONDER INVASIE) IN FUNCTIE VAN DE TIJD. ER WAREN TECHNISCHE (N = 3) EN BIOLOGISCHE (N = 3) REPLICATEN PER CONDITIE. DE LIJNEN GEVEN DE GEMIDDELDE TREND VAN DE REPLICATEN AAN.....	33

FIGUUR 20: RELATIEVE INVADER ABUNDANTIE VAN DE STATIONAIRE INVADER EN DE INVADER MET NUTRIËNTENPULS OVER DE TIJD BIJ VIER VERSCHILLENDE INVASIETIJDSPUNTEN (T1 = 0H, T2 = 3H, T3 = 8H, T4 = 12H NA DE INITIËLE NUTRIËNTENPULS). ER WAREN TECHNISCHE (N = 3) EN BIOLOGISCHE (N = 3) REPLICATEN PER CONDITIE. DE RODE PIJLEN DUIDEN DE TIMING VAN INVASIE AAN.	34
FIGUUR 21: DE TOTALE CELDENSITEITEN VAN TWEE CONTROLES; <i>V. CAMPBELLII</i> EN DE AUTOCHTONE GEMEENSCHAP. ER WAREN TECHNISCHE (N = 3) EN BIOLOGISCHE (N = 3) REPLICATEN PER CONDITIE. DE LIJNEN GEVEN DE GEMIDDELDE TREND VAN DE REPLICATEN AAN.....	35
FIGUUR 22: DE TOTALE CELDENSITEITEN VAN ALLE CONDITIES BIJ CONDITIE A, B, C EN D IN FUNCTIE VAN DE TIJD. CONDITIE A, B, C EN D WERDEN MET ELKAAR VERGELEKEN OM NA TE GAAN OF DE GEMEENSCHAP MEER OF MINDER INVASIERESISTENT IS NA HET VERKRIJGEN VAN HERHAALDELIJKE NUTRIËNTENPULSEN VOOR DE INVASIE. CONDITIE A: INVASIE OP 0H EN NUTRIËNTENPULS OP 0H; CONDITIE B: INVASIE OP 3H EN NUTRIËNTENPULSEN OP 0H EN 3H; CONDITIE C: INVASIE OP 6H EN NUTRIËNTENPULSEN OP 0H, 3H EN 6H; CONDITIE D: INVASIE OP 9H EN NUTRIËNTENPULSEN OP 0H, 3H, 6H EN 9H. ER WAREN BIOLOGISCHE REPLICATEN PER CONDITIE (N = 3). DE RODE PIJLEN DUIDEN DE TIMING VAN INVASIE AAN EN DE GROENE BALKEN TONEN DE TIMING VAN DE NUTRIËNTENPULSEN AAN. DE LIJNEN GEVEN DE GEMIDDELDE TREND VAN DE REPLICATEN AAN.....	36
FIGUUR 23: (A) DE ABSOLUTE INVADER ABUNDANTIE BIJ CONDITIE A, B, C EN D IN FUNCTIE VAN DE TIJD. (B) DE RELATIEVE INVADER ABUNDANTIE BIJ CONDITIE A, B, C EN D IN FUNCTIE VAN DE TIJD. CONDITIES A, B, C EN D WERDEN MET ELKAAR VERGELEKEN OM NA TE GAAN OF DE GEMEENSCHAP MEER OF MINDER INVASIERESISTENT WAS NA HET VERKRIJGEN VAN HERHAALDELIJKE NUTRIËNTENPULSEN VOOR DE INVASIE. CONDITIE A: INVASIE OP 0H EN NUTRIËNTENPULS OP 0H; CONDITIE B: INVASIE OP 3H EN NUTRIËNTENPULSEN OP 0H EN 3H; CONDITIE C: INVASIE OP 6H EN NUTRIËNTENPULSEN OP 0H, 3H EN 6H; CONDITIE D: INVASIE OP 9H EN NUTRIËNTENPULSEN OP 0H, 3H, 6H EN 9H. ER WAREN BIOLOGISCHE REPLICATEN PER CONDITIE (N = 3). DE RODE PIJLEN DUIDEN DE TIMING VAN INVASIE AAN EN DE GROENE BALKEN TONEN TIMING VAN DE NUTRIËNTENPULSEN AAN. DE LIJNEN GEVEN DE GEMIDDELDE TREND VAN DE REPLICATEN AAN.	37
FIGUUR 24: DE TOTALE CELDENSITEITEN BIJ CONDITIE A EN E IN FUNCTIE VAN DE TIJD. CONDITIE A EN E WERDEN MET ELKAAR VERGELEKEN OM NA TE GAAN OF HERHAALDELIJKE NUTRIËNTENPULSEN NA INVASIE DE AANWEZIGHEID VAN <i>V. CAMPBELLII</i> IN DE AUTOCHTONE GEMEENSCHAP KON VERLENGEN. CONDITIE A: INVASIE OP 0H EN NUTRIËNTENPULS OP 0H; CONDITIE E: INVASIE OP 0H EN NUTRIËNTENPULSEN OP 0H, 3H, 6H EN 9H. ER WAREN BIOLOGISCHE REPLICATEN PER CONDITIE (N = 3). DE RODE PIJLEN DUIDEN DE TIMING VAN INVASIE AAN EN DE GROENE BALKEN TONEN DE TIMING VAN DE NUTRIËNTENPULSEN AAN. DE LIJNEN GEVEN DE GEMIDDELDE TREND VAN DE REPLICATEN AAN.	39
FIGUUR 25: (A) DE ABSOLUTE INVADER ABUNDANTIE BIJ CONDITIE A EN E IN FUNCTIE VAN DE TIJD. (B) DE RELATIEVE INVADER ABUNDANTIE BIJ CONDITIE A EN E IN FUNCTIE VAN DE TIJD. CONDITIE A EN E WERDEN MET ELKAAR VERGELEKEN OM NA TE GAAN OF HERHAALDELIJKE NUTRIËNTENPULSEN NA INVASIE DE AANWEZIGHEID VAN <i>V. CAMPBELLII</i> IN DE AUTOCHTONE GEMEENSCHAP KON VERLENGEN. CONDITIE A: INVASIE OP 0H EN NUTRIËNTENPULS OP 0H; CONDITIE E: INVASIE OP 0H EN NUTRIËNTENPULSEN OP 0H, 3H, 6H EN 9H. ER WAREN BIOLOGISCHE REPLICATEN PER CONDITIE (N = 3). DE RODE PIJLEN DUIDEN DE TIMING VAN INVASIE AAN EN DE GROENE BALKEN TONEN DE TIMING VAN DE NUTRIËNTENPULSEN AAN. DE LIJNEN GEVEN DE GEMIDDELDE TREND VAN DE REPLICATEN AAN.	40

Inleiding

Aquacultuur is een voedselproducerende sector die wereldwijd niet meer weg te denken is. De toenemende wereldbevolking, de klimaatveranderingen en de steeds stijgende vraag naar voedsel zorgen ervoor dat deze sector de snelst groeiende voedselproducerende industrie ter wereld is (Pridgeon & Klesius, 2012). De teelt van vis- en schaaldieren in zoetwater en mariene systemen groeide tussen 1990 en 2010 jaarlijks met 7.8 % wereldwijd (Troell et al., 2014). Vis en visafgeleide producten zijn belangrijke handelswaren en zijn goed voor 17 % van de dierlijk afgeleide consumptie wereldwijd. Visproducten zijn één van de meest verhandelde voedselproducten in de wereldeconomie, met een waarde van 129 miljard dollar in 2012. Meer dan drie miljard mensen halen één-vijfde of meer van hun dierlijke proteïnes uit vis (Troell et al., 2014). Uit deze cijfers blijkt dat de aquacultuur een grote rol speelt in het voeden van de snelgroeiende wereldbevolking en dit zal alleen maar stijgen in de toekomst.

Eén groot probleem waar deze industrie mee te kampen heeft, is de frequente uitbraak van ziektes (Figuur 1). Dit zorgt niet alleen voor grote economische verliezen, maar is ook een struikelblok voor de verdere ontwikkeling en groei van deze industrie. Elk jaar bedragen de economische verliezen door ziektes ongeveer drie miljard US dollar (Soumya Haldar, 2012).



Figuur 1: Jaarlijkse garnalenproductie in Thailand van 1978 tot 2014, met aanduiding van de uitbraak van de belangrijkste ziektes (YHV: Yellow head virus, WSSV: White spot syndrome virus, MSGS: monodon slow growth syndrome, EMS: Early mortality syndrome, AHPND: Acute hepatopancreatic necrosis disease) (Mohamed et al., 2016).

Bacteriën (vooral *Vibrio* spp.) zijn één van de belangrijkste pathogenen die deze ziektes veroorzaken, naast fungi, virussen en parasieten (Pridgeon et al., 2012). Door de typische

hoge densiteit van de aquacultuurorganismen in grootschalige producties, kunnen pathogenen zich zeer snel verspreiden in het water, wat zorgt voor een snelle uitbraak van ziektes (Sommerset et al., 2005).

Een veelgebruikte manier om bacteriële ziektes onder controle te houden, is het gebruik van antibiotica. Deze worden niet enkel gebruikt om ziektes te behandelen, maar meer en meer ook voor de preventie ervan. Deze aanpak heeft de snelle groei van de aquacultuurindustrie ondersteund (Cabello et al., 2013) en is op korte termijn winstgevend omdat het economische verliezen voorkomt, maar leidt uiteindelijk tot grote problemen (Christensen et al., 2006). Het gebruik van antibiotica heeft namelijk de ontwikkeling van antibioticaresistentie in de hand gewerkt (Pridgeon et al., 2012). Het overmatig gebruik ervan, inclusief antibiotica die belangrijk zijn in menselijke therapeutica, heeft niet enkel een negatieve impact op de aquacultuursector zelf, maar ook op de algemene gezondheid van mens en dier (Cabello et al., 2013). Een voorbeeld van de ontwikkeling van antibioticaresistentie werd aangetoond in een studie van Karunasagar et al. (1994). Hierbij werden de massale sterfte gevallen in larven van tijgergarnalen (*Penaeus monodon*) veroorzaakt door *Vibrio Harveryi* stammen die resistentie ontwikkeld hadden tegen meerdere antibiotica die gebruikt werden in de kwekerijen. Het ontstaan van antibioticaresistente humane pathogenen zorgt ervoor dat de behandeling van bacteriële infecties zeer moeizaam verloopt (Cabello et al., 2013). Alternatieve methoden die de aquacultuursector kunnen beschermen tegen ziektes zijn dan ook dringend nodig.

1 Literatuurstudie

1.1 Aquacultuurziektes veroorzaakt door *Vibrio* spp.

Bacteriële infecties veroorzaakt door bacteriën van het *Vibrio* genus, zijn de meest voorkomende en belangrijkste infecties in de aquacultuur. De *Vibrionaceae* is een familie van de gammaproteobacteriën die terug te vinden zijn in een brede range van aquatische biotopen. Deze familie bevat verscheidene soorten die darmkanaalinfecties veroorzaken bij mens en dier (Farmer, 2006). Enkele soorten van de familie *Vibrionaceae* die gelinkt zijn aan gezondheidsproblemen van mariene diersoorten zijn *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii* en *V. campbellii* (Ina-Salwany et al., 2019). Enkele voorbeelden van humane pathogenen afkomstig van het *Vibrio* genus zijn *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* en *V. vulnificus* (Darshanee Ruwandeeepika et al., 2012).

Vibriosis, veroorzaakt door een infectie van *Vibrio* spp., is één van de meest voorkomende ziektes die de aquacultuurindustrie hindert (Soumya Haldar, 2012). Vibriosis leidt tot extreme verliezen in de garnalenkweek en veroorzaakt tot 100 % sterfte bij postlarvae en juvenielen garnalen (Darshanee Ruwandeeepika et al., 2012). De symptomen van ziekte bij schaaldieren zijn lethargie, weefsel- en aanhangselnecrose, langzame groei en metamorfose, lichaamsmisvorming, spieropaciteit en melanisatie (Austin & Austin, 2016).

Vibriosis kan alle levensstadia aantasten en leidt tot sterfte bij verschillende soorten zee- en schelpdieren. De interactie tussen gastheer, pathogeen en externe omstandigheden zoals klimaatverandering, slechte hygiëne en management van de gecultiveerde species zorgt voor de ontwikkeling van ziektes. *Vibrio* spp. kunnen goed overleven in aquatische omgevingen en dit onafhankelijk van hun gastheer. Hierdoor wordt de verdere ontwikkeling en duurzame uitbreiding van de aquacultuurproductie sterk beperkt (Ina-Salwany et al., 2019). Hiernaast zorgt water warmer dan 17°C en een hoog zoutgehalte (30 - 35 ‰) voor het sneller uitbreken van ziektes (Pridgeon et al., 2012). Warm water is gunstig voor de overleving en groei van *Vibrio* spp., waardoor de pathogenen zich snel kunnen verspreiden tussen de vissen. Hierdoor is vibriosis vooral een bedreiging voor de aquacultuur in tropisch warme landen (Ina-Salwany et al., 2019). In Maleisië en zijn buurlanden, waar tropische temperaturen van 28°C het jaar rond heersen, is vibriosis reeds vaak geregistreerd in vele aquacultuurbedrijven. Gedurende veel van dergelijke ziekte uitbraken werden *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* en *V. anguillarum* het meest geïsoleerd (Albert & Ransangan, 2013).

Een ander voorbeeld van een ziekte in garnaalkwekerijen is het “acute hepatopancreatic necrosis disease” (AHPND), ook vaak aangeduid als “early mortality syndrome” (EMS). Deze ziekte kwam eerst op in China in 2010 en had zich in 2011 al verspreid in Vietnam, Maleisië en Thailand (De Schryver et al., 2014; Lightner et al., 2012). De ziekte ontwikkelt zich binnen de 20 tot 30 dagen en leidt tot mortaliteit voor 70 tot 100%. AHPND heeft effect op het hepatopancreas en zorgt voor progressieve disfunctie wat leidt tot weefsel schade en degeneratie en disfunctie van de tubulaire epitheelcellen. De eerste symptomen zijn lethargie,

anorexia en een zachte donkere schaal (Lightner et al., 2012). De oorzaak van deze ziekte was initieel gelinkt aan *V. parahaemolyticus*, die een plasmide droeg dat de toxische genen *pirA* en *pirB* bevatte (Muthukrishnan et al., 2019). Maar recente studies hebben aangetoond dat ook andere *Vibrio* soorten zoals *V. campbellii* in Vietnam (Kondo et al., 2015) en in China (Dong et al., 2017), *Vibrio owensii* in China (Xiao et al., 2017), *Vibrio punensis* in Zuid-Amerika (Restrepo et al., 2018) en *V. harveyi* in Maleisië (Muthukrishnan et al., 2019) AHPND veroorzaken. Uit een studie van Muthukrishnan et al. (2019) blijkt dat de *pirA* en *pirB* genen getransfereerd kunnen worden naar niet-pathogene *Vibrio*'s en niet-*Vibrio* bacteriën door middel van horizontale gentransfer. Dit compliceert de identificering van de veroorzaker van AHPND, aangezien ook niet-*Vibrio* bacteriën in overweging moeten genomen worden.

1.1.1 Virulentie factoren van *Vibrio* spp.

Eén van de redenen van de pathogeniciteit van *Vibrio*'s zijn hun virulentiefactoren (Natrah et al., 2011). Door de expressie van deze genproducten is het voor de pathogeen mogelijk om gastheercellen te infecteren en te beschadigen (Darshanee Ruwandeepika et al., 2012). Een succesvolle infectie van de gastheercel is afhankelijk van het vermogen om zich aan het gastheeroppervlak te hechten (Finlay & Falkow, 1989). Virulentiefactoren zoals het flagellum en de pilli spelen een belangrijke rol in deze aanhechting (Chen et al., 2008; Donnenberg, 2000). Hiernaast zijn chitinebindende proteïnen en chitinasen aanwezig in *Harveyi* clade *Vibrio*'s, die ook van belang zijn tijdens de adhesie (Darshanee Ruwandeepika et al., 2012; Svitil et al., 1997).

De productie van exopolysachariden, een groep van extracellulaire polysachariden, helpt bij de ontwikkeling van een biofilm. Het vormt een los slijm buiten de cel dat vervolgens de intercellulaire matrix vormt in biofilms (Darshanee Ruwandeepika et al., 2012; Packiavathy et al., 2013). De biofilm stimuleert de groei, overleving, stresstolerantie en virulentie van *Vibrio* spp. door nutriënten beschikbaar te maken en bescherming te bieden tegen antimicrobiële componenten (Donlan & Costerton, 2002).

Tot slot spelen de lytische enzymen geproduceerd door pathogene bacteriën een beduidende rol in de pathogenese (Finlay et al., 1989). Deze enzymen beschadigen het weefsel van de gastheer, waardoor de pathogeen zich kan verspreiden in het weefsel en nutriënten kan opnemen. Enkele voorbeelden van lytische enzymen geproduceerd door *Harveyi* clade *Vibrio*'s zijn haemolysines, proteases, lipases en chitinasen (Darshanee Ruwandeepika et al., 2012).

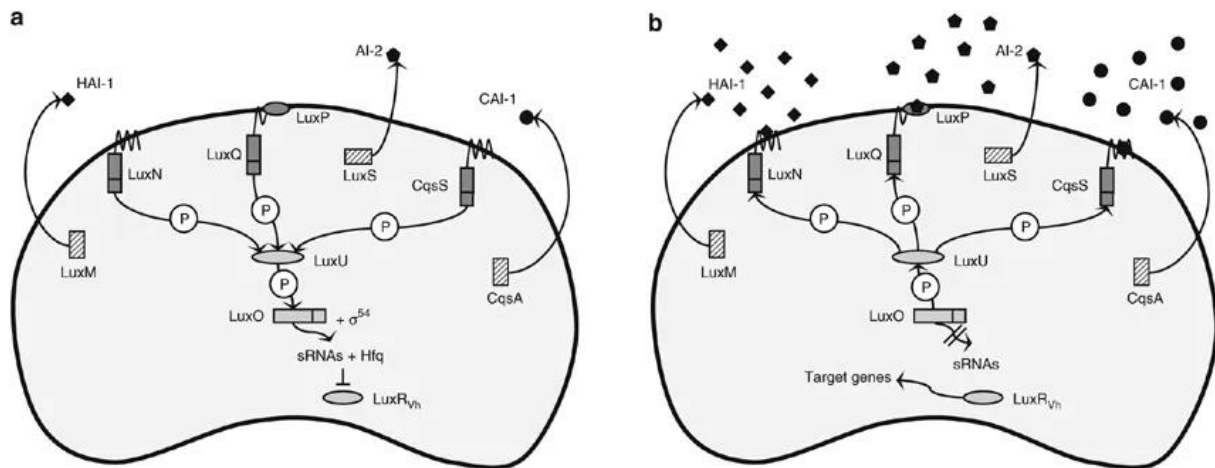
1.1.2 Quorum sensing

Quorum sensing wordt door bacteriën gebruikt als vorm van communicatie en kan de regulatie en productie van virulentiefactoren aansturen (Natrash et al., 2011). Het is de regulatie van de genexpressie in een reactie op celdensiteit via chemische signalering (Miller & Bassler, 2001). Bij quorum sensing produceren de bacteriën signaalmoleculen, genaamd autoinducers, waarvan de concentratie toeneemt in functie van de celdensiteit. Bacteriën detecteren de concentratie van autoinducers en passen hun genexpressie en bijgevolg dus ook hun gedrag aan. Bacteriën kunnen hierdoor hun gedrag synchroniseren en functioneren als meercellige organismen (Waters & Bassler, 2005). Het vermogen om zich als een groep te gedragen, heeft zijn voordelen. Een voorbeeld is de mogelijkheid om zich te verplaatsen naar een meer geschikte omgeving. Dit doordat een andere omgeving een betere nutriëntenvoorziening biedt of om een nieuwe groeimethode toe te passen zoals sporulatie of biofilmvorming (De Kievit & Iglewski, 2000). Gram-negatieve en -positieve bacteriën gebruiken quorum sensing circuits om verscheidene fysiologische activiteiten te reguleren. Deze activiteiten omvatten symbiose, virulentie, competentie, conjugatie, antibioticaproductie, motiliteit, sporulatie en biofilm formatie. Over het algemeen gebruiken gram-negatieve bacteriën geacyleerde homoserine lactonen (AHL) als autoinducers, terwijl gram-positieve bacteriën oligopeptiden gebruiken om te communiceren (Miller et al., 2001).

1.1.2.1 Quorum sensing bij de *Harveyi* clade

Vibrio's van de *Harveyi* clade hebben een specifiek drie-kanaals quorum sensing systeem (Figuur 2). Het eerste kanaal wordt gecontroleerd door de autoinducer 1 (HAI-1), een AHL (Cao & Meighen, 1989). Het tweede kanaal wordt gecontroleerd door de autoinducer 2 (AI-2), wat een furanosylboraatdiester is (Chen et al., 2002). De derde autoinducer, de cholera autoinducer 1 (CAI-1), is (S)-3-hydroxy tridecaan-4-one (Higgins et al., 2007). De autoinducers worden gedetecteerd aan het celoppervlak door een membraangebonden, twee-component receptorproteïne (LuxN, LuxQ en CqsS respectievelijk) dat een fosforylatie of defosforylatie signaaltransductiecascade uitvoert (Taga & Bassler, 2003).

Centraal in de signaaltransductiecascade ligt het LuxO-eiwit. Gefosforyleerde LuxO inhibeert indirect de productie van het transcriptionele regulator-eiwit LuxR_{Vh} door de werking van vijf kleine regulerende RNA's (Tu & Bassler, 2007). LuxR_{Vh} activeert rechtstreeks het lux-operon (Swartzman et al., 1992), terwijl de meerderheid van de andere door quorum sensing gereguleerde genen indirect door LuxR_{Vh} worden gecontroleerd (Waters & Bassler, 2006). De concentratie van LuxR_{Vh} hangt af van de concentraties van de vijf kleine regulerende RNA's, die worden bepaald door de fosforyleringsstatus van LuxO. De fosforyleringsstatus van LuxO wordt op zijn beurt bepaald door het netto resultaat van de kinase- en fosfatase-activiteiten van de drie receptoren en is dus afhankelijk van de concentraties van de drie autoinducers (Tu et al., 2007).



Figuur 2: Quorum sensing in *V. harveyi*. (a) De auto-inducers zijn afwezig, waardoor LuxO wordt gefosforyleerd, wat op zijn beurt ervoor zorgt dat het LuxR_{Vh}-eiwit niet geproduceerd wordt. (b) Bij een hoge concentratie van de autoinducers wordt LuxO gedefosforyleerd, wat uiteindelijk leidt tot de vorming van het LuxR_{Vh}-eiwit (Defoirdt et al., 2008).

Bij afwezigheid van autoinducers (Figuur 2a) autofosforyleren en transfereren de receptoren fosfaat naar LuxO via LuxU. Fosforylering activeert LuxO, dat samen met σ^{54} de productie van vijf kleine regulerende RNA's (sRNA's) activeert. Deze sRNA's, samen met het chaperonne Hfq, destabiliseren het mRNA dat codeert voor de transcriptionele regulator LuxR_{Vh}. Bij de afwezigheid van autoinducers wordt het LuxR_{Vh}-eiwit niet geproduceerd (Defoirdt et al., 2008).

Bij hoge concentraties aan autoinducers (Figuur 2b) schakelen de receptoreiwitten van kinasen naar fosfatasen om, wat resulteert in defosforylering van LuxO. Gedefosforyleerd LuxO is inactief, waardoor de sRNA's niet gevormd worden en de transcriptionele regulator LuxR_{Vh} wel geproduceerd wordt (Defoirdt et al., 2008).

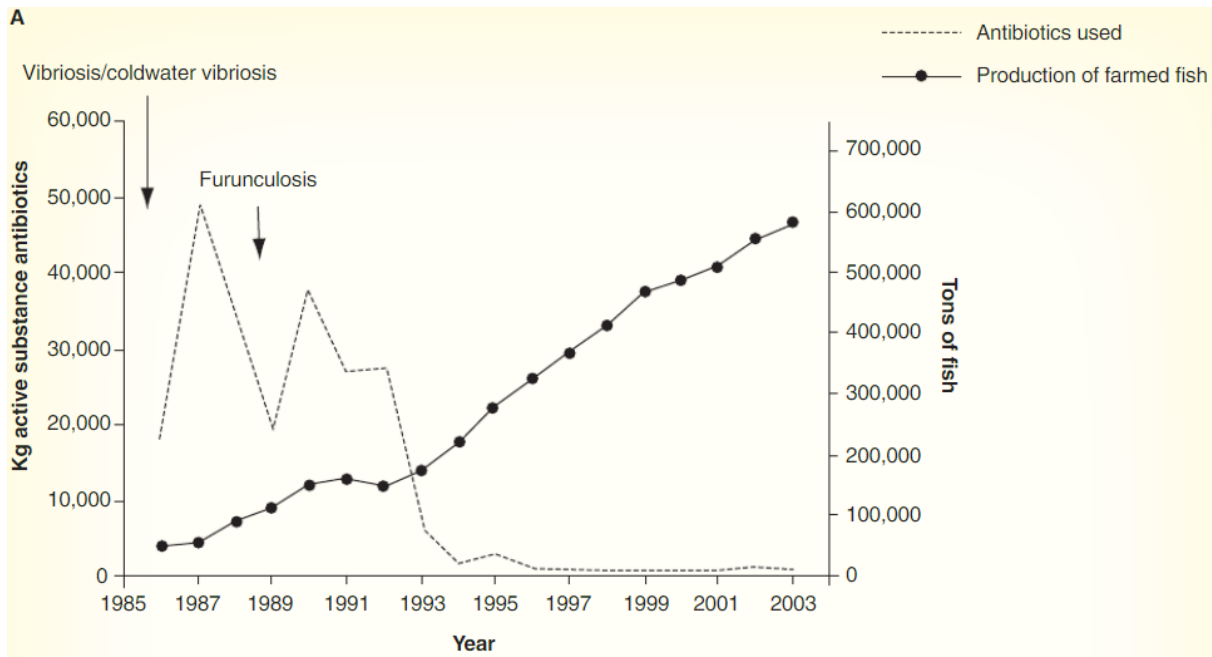
1.2 Microbieel management in aquacultuur

Het managen en controleren van microbiomen in de aquacultuur heeft een enorm groot potentieel. De sturing van microbiële gemeenschappen kan niet alleen de kwaliteit van het water verbeteren, maar biedt bovendien ook de mogelijkheid om de abundantie van pathogene bacteriën te verminderen, wat bijgevolg leidt tot betere overlevingskansen voor de gecultiveerde organismen. Deze strategie zou het gebruik van antibiotica kunnen verminderen (Bentzon-Tilia et al., 2016). De huidige strategieën van microbieel management worden hieropvolgend besproken.

1.2.1 Vaccinaties

Het gebruik van vaccinaties is een belangrijke strategie naar controle van ziektes in de moderne aquacultuur en commerciële visteelt. Een goed management van de gecultiveerde organismen, met goede hygiëne en gelimiteerde stressfactoren, is essentieel voor het optimale effect van vaccins (Sommerset et al., 2005). Vaccinaties van zalmkwekerijen in Europa, Amerika en Japan worden al 30 jaar gebruikt en hebben tot een enorme daling van het gebruik

van antibiotica geleid (Figuur 3) (Pridgeon et al., 2012). Een voorbeeld van deze succesvolle implementatie is terug te vinden in de productie van Atlantische zalm en forel in Noorwegen op het totale therapeutisch gebruik van antimicrobiële middelen. Van 1987 tot 2003 verlaagde het totaal antibioticagebruik in de viskwekerijen in Noorwegen van 4.8×10^4 kg tot minder dan 10^3 kg (Somerset et al., 2005). Dit terwijl de totale visproductie in Noorwegen gestegen was van 5×10^4 ton tot 6×10^5 ton tussen 1987 en 2003 (Somerset et al., 2005).



Figuur 3: Het gebruik van antibiotica en de groei van de visproductie van de Noorse aquacultuurindustrie van 1986 tot 2003 (Somerset et al., 2005).

Het gebruik van vaccinaties is veelbelovend voor de toekomst. Hoewel er verscheidene vaccins op de markt zijn, is de nood naar vaccins tegen recente ziektes nog steeds hoog. Bovendien moeten de meeste vaccins aangeleverd worden via een individuele injectie, wat arbeidsintensief is. Dit kan stress induceren bij de dieren, waardoor ze minder goed of trager zullen groeien. Deze vertraagde groei kan de dieren bovendien gevoeliger maken voor andere infecties (Somerset et al., 2005). Efficiëntere methoden zoals onderdompeling of orale aanlevering zijn nodig voor een betere en langdurige bescherming van de aquacultuurindustrie (Pridgeon et al., 2012). Een ander nadeel van vaccinaties is dat het enkel werkt bij dieren met een ontwikkeld adaptief immuunsysteem. Schaaldieren horende bij de invertebraten en vislarven hebben enkel een aangeboren immuunsysteem waardoor vaccinatie bij deze groepen van dieren niet toepasbaar is (Bentzon-Tilia et al., 2016). Alternatieve methoden zijn hier dus vereist.

1.2.2 Pre-, pro- en synbiotics

Een voorbeeld van een alternatief microbiële managementstrategie is het gebruik van pre-, pro- en synbiotics. Deze additieven worden in de aquacultuur gebruikt om ziektes te bestrijden, om groei te bevorderen en worden gebruikt als alternatieve antimicrobiële middelen (Akhter et al., 2015). Probiotics zijn levende microbiële middelen die een positief effect hebben op de gekweekte organismen. De voordelen hiervan zijn groeibevordering, pathogeeninhibitie, betere nutriëntenverteerbaarheid, het verbeteren van de waterkwaliteit en stresstolerantie en tot slot het bevorderen van de reproductie (Martínez Cruz et al., 2012). Recente studies hebben aangetoond dat vispathogene bacteriën in levend voer beheerst kunnen worden door probiotica. Bovendien kan de mortaliteit van geïnfecteerde vislarven aanzienlijk verminderd worden door probiotische bacteriën (Bentzon-Tilia et al., 2016). De interesse naar deze milieuvriendelijke methode neemt dan ook snel toe.

Verscheidene werkingsmechanismen van probiotica zijn gekend tegen pathogene bacteriën. Een eerste is de competitieve uitsluiting van pathogene bacteriën, waarbij een ontwikkeld microbiota ervoor zorgt dat de kolonisatie en introductie van een bacterieel pathogeen in de darm wordt verminderd of voorkomt. Een tweede werkingsmechanisme is de productie van chemische componenten die inhiberend zijn voor pathogenen (bacterieel antagonisme). Tot slot zijn de verbetering van de immuunrespons tegen pathogene micro-organismen en de productie van antivirale effecten nog twee voorbeelden van mechanismen (Pandiyan et al., 2013). De melkzuurbacteriën zijn één groep van probiotische bacteriën die reeds gerapporteerd zijn omwille van hun positieve effecten in de larven aquacultuur (Gatesoupe, 1994; Venkat et al., 2004). Deze probiotica zijn aanwezig in de darm van gezonde vissen (Ringø & Gatesoupe, 1998) en hebben het vermogen om het darmkanaal te koloniseren en weerstand te bieden tegen een lage pH en galzouten (Bentzon-Tilia et al., 2016).

Een andere groep van vaak bestudeerde probiotica zijn de *Bacillus* spp. Hierbij werd aangetoond dat ze een adhesievermogen bezitten, bacteriocinen produceren en zorgen voor immunostimulatie (Cherif et al., 2001; Duc et al., 2004). Ook is aangetoond dat de expressie van virulentiefactoren verminderd wordt in *Aeromonas hydrophila* door middel van quorum sensing inhibitie, wat de overlevingsgraad van de gecultiveerde vissen doet stijgen (Chu et al., 2014).

Een prebioticum is een onverteerbare component die een gunstig effect heeft op de gastheer door de groei en activiteit van natuurlijk voorkomende bacteriën in het maag-darmkanaal te stimuleren. Voorbeelden van prebiotica zijn fructo-oligosacharide, mannan-oligosacharide, inuline of β -glucaa. Ondanks de vele mogelijke voordelen dat prebiotica bieden voor de gezondheid en de groei van verschillende landdieren, is het gebruik van prebiotica bij de teelt van vis en schelpdieren minder onderzocht (Akhter et al., 2015). Synbiotica, een volgende klasse van componenten, is een mengsel van pre- en probiotica. Het combineert de positieve effecten van pre- en probiotica en zorgt in het algemeen voor een stijging van de gezondheid, bevordering van de groei en bescherming tegen pathogene bacteriën (Okey et al., 2018).

1.2.3 Biofloc technologie

Biofloc technologie is een voorbeeld van een strategie die microbiële gemeenschappen aanstuurt en probeert te manipuleren. Deze milieuvriendelijke techniek maakt gebruik van een gesloten aquacultuursysteem, waarbij water wordt hergebruikt. Dit zorgt ervoor dat nutriënten worden gerecycled en hergebruikt. Zo wordt ook het risico op de introductie van pathogenen in het milieu en het lozen van afvalwater gereduceerd (Emerenciano et al., 2013). Het is een techniek die de kwaliteit van het water verbeterd door toevoeging van een extra koolstofbron aan het systeem. Dit leidt tot een bevorderende stikstofopname door de bacteriële groei, wat op zijn beurt leidt tot een daling van de ammoniumconcentratie in het water, dewelke sneller gebeurt dan via nitrificatie (Hargreaves, 2006). Naast de betere waterkwaliteit leidt de opname van stikstof ook tot een stijging in bacteriële biomassa. Dit resulteert in de vorming van bacteriële macroaggregaten (bioflocs) die dienen als voeding voor de gekweekte vissoorten (Bentzon-Tilia et al., 2016; Crab et al., 2012). Biofloc technologie maakt het mogelijk om watergebruik en -lozing te minimaliseren in een aquacultuursysteem door de waterkwaliteit op peil te houden. Hiernaast produceert het ook goedkope proteïnerijke bioflocs die als voeding dienen. Uit een studie van Crab et al. (2010) werd aangetoond dat deze techniek ook gekweekte organismen kan beschermen tegen infecties met pathogene bacteriën. Hierbij inhiberden bioflocs de quorum sensing gereguleerde bioluminescentie in *V. harveyi* en werden zo de *Artemia*-larven beschermd tegen vibriosis.

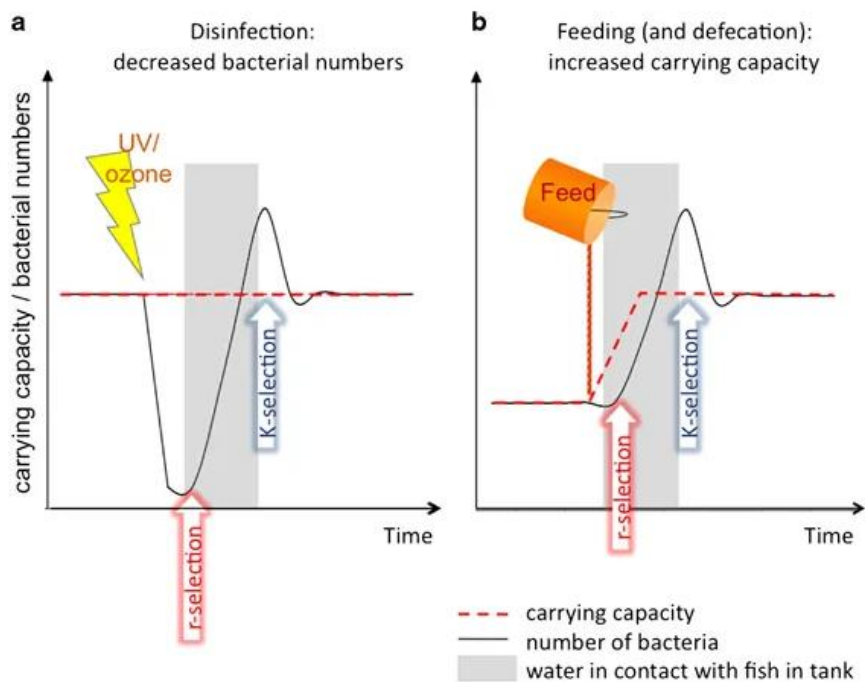
1.2.4 Green water technologie

De green water technologie is een techniek waarbij eencellige groene algen, zoals *Chlorella* en/of *Nannochloropsis*, worden geteeld in een reservoir waarbij aquacultuurorganismen aanwezig zijn. Dit water wordt dan gebruikt voor het cultiveren van vissoorten of voor het aanvullen van kweekvijvers na verlies van water (Cremen et al., 2007). Studies hebben reeds aangetoond dat deze techniek resulteert in een verlaagde frequentie van EMS (Lio-Po et al., 2005; Tendencia & de la Peña, 2010) en in een verlaagde belasting van het white spot syndrome virus (WSSV) in *P. monodon* kweekvijvers (Tendencia et al., 2012). Er zijn meerdere mechanismen die gelinkt zijn aan de positieve effecten van green water technologie, zoals de productie van antibacteriële componenten (Kokou et al., 2012) en quorum sensing inhibitoren door algen, die de virulente genregulatie inhiberen (Natrah et al., 2011). De microalgen- en bacteriële gemeenschap concurreren tevens ook met pathogenen voor de aanwezige nutriënten en kunnen componenten produceren die de activiteit en groei kunnen reduceren (Natrah et al., 2014). Het toevoegen van gunstige microbiële gemeenschappen aan verschillende mariene systemen kan het ecosysteem dus positief beïnvloeden (Bentzon-Tilia et al., 2016).

1.2.5 r/K selectie strategie

Een laatste managementstrategie die wordt besproken is de r/K selectie strategie. De r/K selectie theorie speelt zich af in microbiële gemeenschappen en wordt als volgt gedefinieerd; een omgeving die rijk is aan voedingsstoffen per cel, weinig concurrentie en frequente verstoringen ervaart, creëert een omgeving voor micro-organismen met een hoge capaciteit om voedingsstoffen te benutten en de populatiegrootte te laten toenemen. Dit worden de snelgroeiende, opportunistische r-strategen genoemd. Veel pathogenen vertonen dit gedrag. Hiertegenover zal een meer stabiele omgeving met minder voedingsstoffen per cel en dus een hoge interspecifieke concurrentie, selecteren voor langzaam groeiende, competitie-specialisten, de K-strategen genoemd (Wilson & MacArthur, 1988). De opportunistische pathogenen, die ziektes veroorzaken in aquacultuur (zoals pathogene *Vibrio*'s), zijn typische r-strategen en hebben dus de mogelijkheid om hun populatiegrootte snel uit te breiden wanneer de condities gunstig zijn (De Schryver & Vadstein, 2014; Vadstein et al., 2013).

De huidige perceptie bij aquacultuurbedrijven is dat de microbiële belasting van het kweekwater zo laag mogelijk moet zijn, waardoor desinfectie (ozonisatie of ultraviolette irradiatie) een standaardprocedure is voor waterbehandeling. Het resultaat van deze desinfectie is een sterk verstoorde microbiële gemeenschap, dewelke vanuit een microbiële ecologisch standpunt meer slecht dan goed doet wat betreft de controle van ziektes (Attramadal et al., 2012). De huidige handelingen die uitgevoerd worden in de aquacultuursector, zoals desinfectie en heel frequente toediening van voeding, geven de voorkeur aan pathogene r-strategen (Figuur 4). Desinfectie van het influent (Figuur 4a) wordt uitgevoerd als een barrière tegen de introductie van pathogenen in het systeem. Desinfectie vermindert echter het aantal bacteriën (de microbiële draagkracht), wat de competitie tussen bacteriën doet wegvallen en resulteert in de groei van snelgroeiende r-strategen. Toevoeging van voeding aan het systeem (Figuur 4b) zal de microbiële draagkracht in de tanks direct en indirect (via defecatie) verhogen. Deze toename van microbiële draagkracht zal ook resulteren in r-selectie (De Schryver & Vadstein, 2014).



Figuur 4: Twee voorbeelden van hoe de huidige aquacultuurpraktijken de r-selectie gaan bevorderen, wat de kans op pathogeeninvasie en schadelijke infecties verhoogt (De Schryver & Vadstein, 2014).

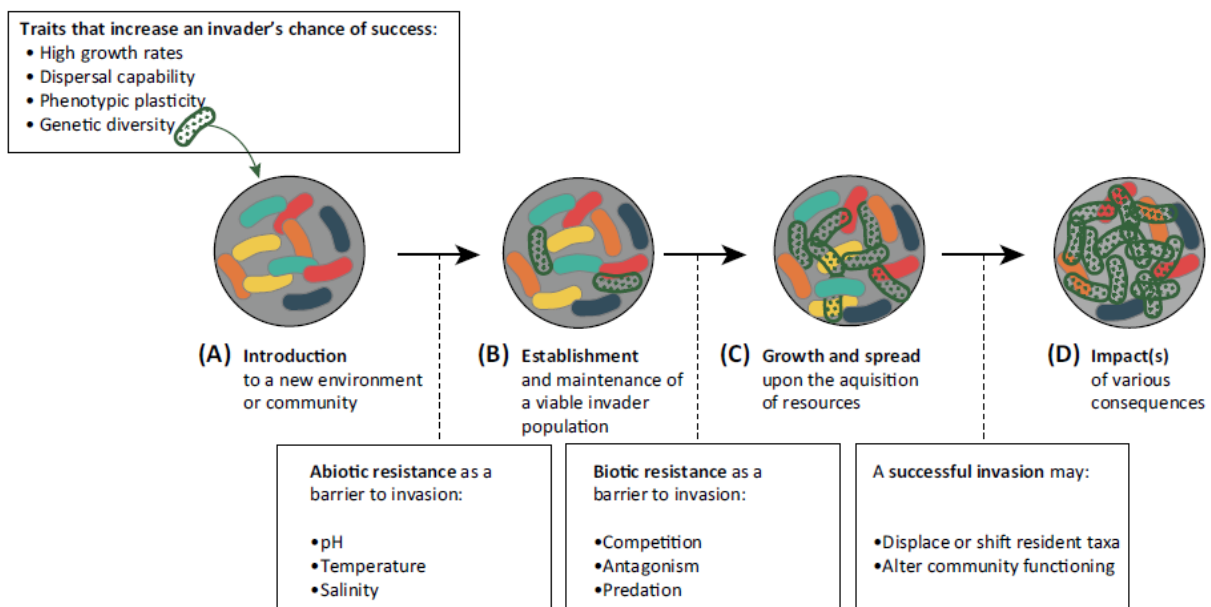
Op basis van het r/K selectie principe, kan de microbiota in het water gemanaged en gestuurd worden zodat de kans op de introductie van pathogenen verminderd wordt. Dit door het creëren van langzame groeiomstandigheden die gunstiger zijn voor K-strategen (De Schryver & Vadstein, 2014). Deze groeiomstandigheden kunnen bekomen worden door een gecontroleerde microbiële kolonisatie van het influent met K-strategen en door het vermijden van grote fluctuaties in nutriëntconcentraties in het water. Dit wordt bereikt door een voedingsregime toe te passen dat bestaat uit een continue toevoeging van laaggeconcentreerde voedingsdosissen in plaats van een regime met voedingspulsen met hoger geconcentreerde dosissen (Defoirdt, 2016). Door het toepassen van een continue toevoeging van laaggeconcentreerde voedingsdosissen zijn de opgeloste nutriënteniveaus laag door de consumptie van de microbiota in het water. De r-strategen worden weggeduwd uit de gemeenschap en de kans voor opportunistische r-strategen om de gemeenschap te invaderen, wordt geminimaliseerd (Attramadal et al., 2012; Attramadal et al., 2014). Het is recent aangetoond dat deze aanpak van het stabiliseren van de microbiële gemeenschap leidt tot een 65 - 70 % stijging in overleving van gekweekte Atlantische kabeljauw larven. Dit toont aan dat een ecologische aanpak als basis kan dienen om een gemeenschap in de gewenste richting te sturen (Attramadal et al., 2014).

1.3 Microbiële invasie

Een microbiële invasie is de intrede en de vestiging van niet-autochtone micro-organismen in een microbiële gemeenschap (Kinnunen et al., 2016). Microbiële gemeenschappen vormen ecologische netwerken van samenlevende en -werkende soorten. Invasieve micro-organismen hebben het potentieel om de structuur van een gemeenschap en de bestaande onderlinge interacties te verstoren, wat het functioneren van het ecosysteem beïnvloedt met eventuele economische gevolgen (Barberán et al., 2012; Padrón et al., 2009). Indien de invader erin slaagt om de meest interagerende en belangrijkste soort weg te duwen in de gemeenschap is het ecologisch netwerk zeer vatbaar om ineen te storten (Albrecht et al., 2014). Dit leidt tot een groot effect op het functioneren van het ecosysteem (O'Dowd et al., 2003). De interesse naar studies over invasie van microbiële gemeenschappen neemt sterk toe, met een grote toename van publicaties over invasies door pathogene, gunstige of samenwerkende microben. Een beter inzicht over microbiële invasie zou veel kennis verschaffen in het voorkomen van ziektes bij mens en dier, zoals bijvoorbeeld in de aquacultuursector (Kinnunen et al., 2016).

1.3.1 De vier stappen van invasie

Een microbiële invasie kan opgedeeld worden in een vierdelig proces bestaande uit (1) de introductie, (2) de vestiging, (3) de groei en verspreiding en (4) de impact (Figuur 5) (Mallon et al., 2015).



Figuur 5: Het proces van een microbiële invasie (Mallon et al., 2015). (A) introductie; (B) vestiging; (C) groei en verspreiding; (D) impact.

Alvorens de invasie kan plaatsvinden, moet de invader eerst getransporteerd worden van zijn bron naar de gemeenschap (Mallon et al., 2015). Dit kan via passief of actief transport. Een voorbeeld van passief transport is de circulatie van mariene bacteriën via de oceaanstromen

(Müller et al., 2014). Passieve verspreidingsmechanismen transporteren bacteriën over een afstand of tot locaties waarbij ze normaal niet gevonden zouden worden (Mallon et al., 2015). Een voorbeeld van actief transport, dat voorkomt bij vele *Vibrio*'s, is de flagellaire motiliteit. Dit soort mobiliteit geeft de invader een groot voordeel in de competitie voor nutriënten.

Bij de tweede stap (de vestiging van de invader in de gemeenschap) moet de invader de abiotische en biotische condities van de nieuwe omgeving doorstaan. Het is in deze stap dat de invader de grootste weerstand krijgt van de autochtone gemeenschap en hier wordt bepaald of de invader het vermogen heeft om te groeien en zich te verspreiden (Mallon et al., 2015).

De hierop volgende groei- en verspreidingsfase van een invasie wordt gestimuleerd door het gebruik van voorheen niet-beschikbare lokale nutriënten. Invaders kunnen hun nieuwe omgeving direct manipuleren en de biotische druk van de aanwezige gemeenschap omzeilen, om zo ecologische niches te creëren en hun groei en introductie in de nieuwe omgeving te versterken. Een voorbeeld hiervan is de pathogeen *Salmonella enterica* die een ontsteking veroorzaakt in de darm, wat de groei van de commensale microbiota onderdrukt en de productie van *Salmonella* specifieke substraten stimuleert (Thiennimitr et al., 2011). Hiernaast kunnen invaders ook gebruik maken van verstoringen en wijzigingen in de omgeving (bijv. de stijging van de watertemperatuur door klimaatveranderingen) om de invasie gunstig te maken (Mallon et al., 2015).

De gevolgen van een succesvolle invasie kunnen desastreus zijn voor de omgeving en kunnen leiden tot extreme economische verliezen, doch kan het ook leiden tot een neutrale of een positieve impact op de omgeving. Aan de andere kant kan een niet-succesvolle invasie ook een impact hebben en dit door een kleine groei van de invader in de vestigingsfase (Mallon et al., 2015).

1.3.2 Factoren die invasie beïnvloeden

1.3.2.1 Diversiteit van de gemeenschap

Studies van Naeem et al. (2000) en Kennedy et al. (2002) toonden aan dat de weerstand van de autochtone gemeenschap ten opzichte van de invader afhing van de diversiteit van deze gemeenschap. Zowel de soortrijkheid als soortgelijkheid zijn belangrijke factoren die de invasieresistentie van microbiële gemeenschappen beïnvloeden (De Roy et al., 2013; Eisenhauer et al., 2013). Meer diverse gemeenschappen zijn doorgaans resistenter tegen invasie in vergelijking met minder diverse gemeenschappen, wat ook het diversiteit-invasie effect wordt genoemd (Mallon et al., 2015). Een reden hiervoor kan zijn dat meer diverse gemeenschappen zich beter in de omgeving verspreiden en de aanwezige nutriënten zo beter en meer kunnen benutten (Eisenhauer et al., 2013). Hiernaast kan een meer diverse gemeenschap ook bacteriële soorten bevatten die een antagonistisch effect hebben (Fargione & Tilman, 2005) tegen de invader of die bijdragen aan elkaars invasieresistentie (Bruno et al.,

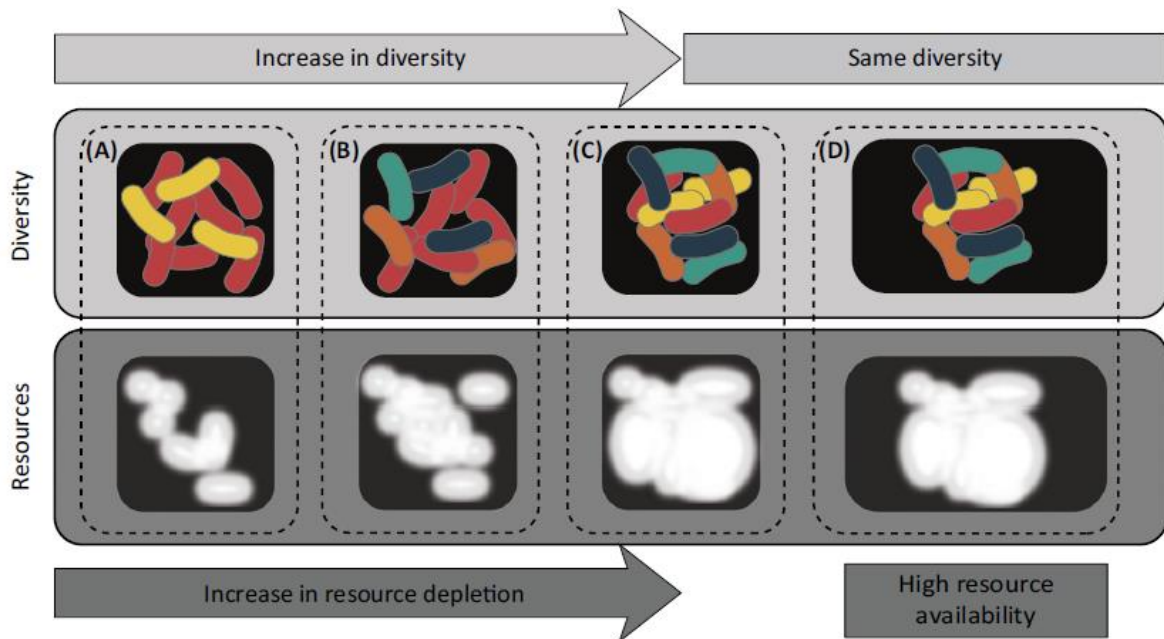
2003). Microbiële soortrijkheid moet gemaximaliseerd worden om de kans op pathogene invasie te verkleinen (De Schryver & Vadstein, 2014).

Hiernaast is soortgelijkheid ook een belangrijke factor die meespeelt in de invasieresistentie. In het geval van sterk ongelijke gemeenschappen hangt de invasieresistentie af van de dominante soort (Hillebrand et al., 2008). Hierbij kan in het ene geval de gemeenschap de invasie enkel verhinderen als de dominante soort een sterk concurrerende omgeving vormt voor de invader. In het andere geval kan de dominante soort ook overtroffen worden door de invader. In meer gelijkmatige gemeenschappen kan de bescherming tegen invasie worden verspreid over verschillende soorten en over een groter aantal functies beschikken die invasie kunnen voorkomen. De samenwerking van soortrijkheid en -gelijkheid is een drijvende kracht voor de resistentie tegen invasie (Mallon et al., 2015).

De dynamiek en de snelheid waarmee een microbiële gemeenschap verandert, beïnvloedt de functionaliteit en daardoor ook zijn invasiepotentieel (De Schryver & Vadstein, 2014). Bij larven van mariene dieren is de darmgemeenschap echter zeer dynamisch vanwege de dichte associatie met de microbiota van de omgeving (Bakke et al., 2013; Rawls et al., 2006). Snel veranderende gemeenschappen ontwikkelen een verstoorde omgeving, met open niches en een gebrek aan antagonistische soorten, die meer vatbaar is voor invasie. De microbiële dynamiek van de darm moet worden beperkt tot de normale opeenvolging van populaties. In de praktijk betekent dit dat stress bij de dieren moet worden vermeden, dat constante omgevingscondities moeten worden aangehouden en dat plotse veranderingen in de voeding moeten worden beperkt (De Schryver & Vadstein, 2014).

1.3.2.2 Nutriëntenbeschikbaarheid

De diversiteit van de autochtone gemeenschap is niet de enige factor die invasieresistentie beïnvloedt. De verandering van de nutriëntenbeschikbaarheid, door toevoeging van nutriënten, kan de relatie tussen diversiteit en invasie doen omkeren door het wegvallen van de competitie voor nutriënten (Davis et al., 2000). Hierdoor kunnen invaders gebruik maken van de aanwezige componenten en zich zelfs in zeer diverse gemeenschappen ontwikkelen (Mallon et al., 2015). Uit de reeds aangehaalde studies blijkt dat er een wisselwerking bestaat tussen de biologische diversiteit en nutriëntenbeschikbaarheid en dat deze de invasieresistentie van de gemeenschap bepalen (Figuur 6) (Mallon et al., 2015).



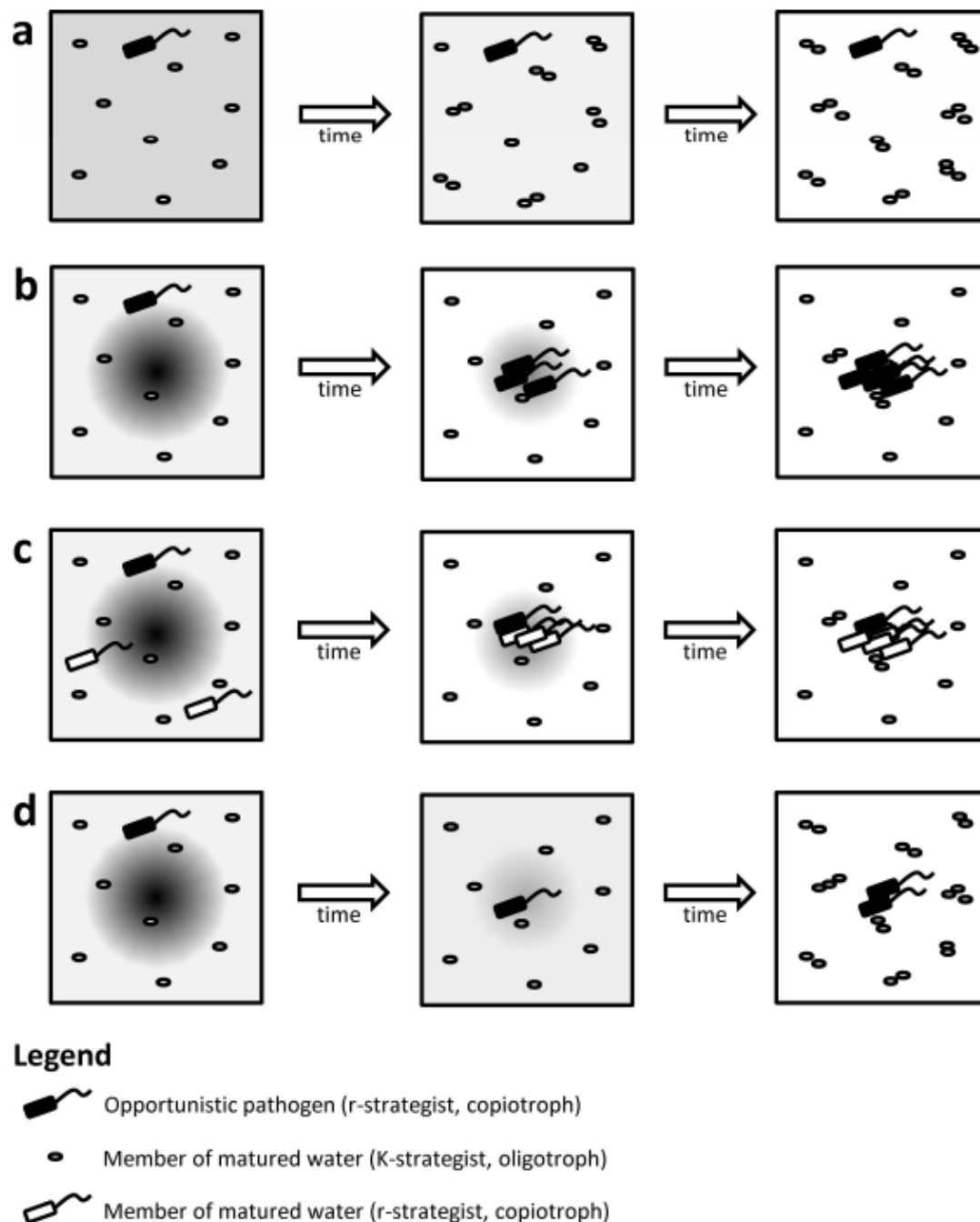
Figuur 6: De wisselwerking tussen de biologische diversiteit en nutriëntenbeschikbaarheid voor het bepalen van de invasieresistentie (Mallon et al., 2015). Het bovenste, lichtgrijze gebied toont de gemeenschappen met toenemende soortrijkheid en soortgelijkheid (tot blok C) en met vergelijkbare celabundantie. Het onderste, donkergrijze gebied geeft het totaal aantal nutriënten weer dat beschikbaar is voor de gemeenschap (zwart) en het aantal dat daadwerkelijk wordt verbruikt (wit).

Gemeenschappen met een lage diversiteit verbruiken niet alle aanwezige nutriënten (Figuur 6A). Indien een invader in deze omgeving terechtkomt, kan het de ongebruikte nutriënten benutten, waardoor de kans op een succesvolle invasie hoog is. Als de diversiteit stijgt, zullen de aanwezige beschikbare nutriënten dalen (Figuur 6B). Deze daling in nutriëntenbeschikbaarheid zorgt voor een stijging in competitie tussen de micro-organismen, wat de kans op een succesvolle invasie doet dalen. Hoe meer de diversiteit stijgt, hoe dichter het nutriëntenverbruik zijn maximum nadert (Figuur 6C). Op dit punt is een succesvolle invasie zeer onwaarschijnlijk door het ontbreken van nutriënten voor de groei. Door toevoeging van een nutriëntenpuls, dat de nutriëntenbeschikbaarheid doet stijgen, kan er toch een succesvolle invasie optreden, ongeacht de diversiteit van de gemeenschap (Figuur 6D). Om te concluderen wordt de kans op een succesvolle invasie bepaald door het vermogen van de microbiële gemeenschap om de aanwezige nutriënten te benutten en hiervoor te concurreren met de invader (Mallon et al., 2015).

1.3.2.3 Nutriëntendistributie

Nutriënten die aanwezig zijn in het kweekwater van een aquacultuursysteem zijn niet homogeen verdeeld, maar komen voor als nutriëntenpartikels, dewelke hotspots met hoge nutriëntenconcentraties vormen (Stocker, 2012). Opportunistische r-strategen kunnen deze nutriëntrijke hotspots exploiteren door hun metabole flexibiliteit en motiliteit. Dit geeft hen de mogelijkheid om zich snel aan te passen aan de nieuw gecreëerde omgeving en hun

populatiegrootte snel uit te breiden (Ayo et al., 2001; Defoirdt, 2016). De mate waarin nutriënten zijn verdeeld in een aquacultuursysteem heeft een grote invloed op het invasiepotentieel van een opportunistisch pathogeen (Figuur 7) (Defoirdt, 2016).



Figuur 7: Schematische representatie van de invloed van nutriëntendistributie op de mogelijkheden voor een opportunistisch pathogeen om een autochtone microbiële gemeenschap te invaderen in een aquacultuursysteem (Defoirdt, 2016). Hoe donkerder de kleur, hoe hoger de nutriëntenconcentratie. (A) De nutriënten zijn homogeen verdeeld, waardoor de K-strategen de nutriënten kunnen gebruiken en de populatiegrootte van de pathogeen niet kan stijgen. (B) De nutriënten zijn niet homogeen verdeeld (zoals in de praktijk), waardoor de motiele pathogenen de nutriënten kunnen exploiteren. (C) Naast de geïnvadeerde, opportunistische pathogenen en de K-strategen bevat de microbiële gemeenschap ook r-strategen, waardoor het in competitie kan gaan voor nutriënten met de pathogeen. (D) Indien voederkorrels worden gebruikt die snel uiteenvallen, zullen ze zich snel verspreiden, waardoor de mogelijkheid waarin opportunistische pathogenen de hotspots kunnen gebruiken veel kleiner wordt.

In de situatie waarbij nutriënten homogeen verdeeld zijn in een systeem, kunnen K-strategen de nutriënten gebruiken en is de kans op invasie door pathogenen sterk beperkt (Figuur 7A). In de praktijk zijn nutriënten niet homogeen verdeeld maar aanwezig als hotspots. De niet-motiele K-strategen worden weggeconcurrerd door de pathogenen, die de nutriëntenbronnen kunnen lokaliseren en exploiteren, waardoor de populatiegrootte en de kans op invasie stijgt (Figuur 7B).

Indien de microbiële gemeenschap zelf ook r-strategen bevat, kunnen zij concurreren voor de aanwezige nutriëntenbronnen in de hotspots met de opportunistische pathogenen. Hierdoor zal de opportunistische pathogeen niet alle hotspots kunnen exploiteren, waardoor zijn populatiegrootte niet zo fel kan stijgen als in situatie B (Figuur 7C). Deze situatie zou als uitgangspunt kunnen dienen voor een microbiële managementstrategie. Hierbij zouden niet-pathogene r-strategen toegevoegd worden aan het kweekwater, waardoor deze een ecologische niche kunnen bezetten die vatbaar is voor invasie door opportunistische pathogenen.

Als er voederkorrels worden gebruikt die snel uiteenvallen, is de mogelijkheid waarin opportunistische pathogenen de hotspots kunnen gebruiken veel kleiner. De voedingsstoffen diffunderen en verspreiden zich, waardoor de hotspots met hoge nutriëntencentraties worden vermeden. K-strategen kunnen hierdoor een groter deel van de nutriëntenbronnen gebruiken en de r-strategen kunnen hun populatiegrootte niet snel uitbreiden (Figuur 7D).

1.4 Doelstellingen

De frequente uitbraken van bacteriële ziektes en de economische verliezen die hiermee gepaard gaan, vormen een bedreiging voor de duurzame uitbreiding van de aquacultuursector. Momenteel worden antibiotica, zowel curatief als preventief, gebruikt om pathogene bacteriën te bestrijden. Dit leidt tot de ontwikkeling van antibioticaresistentie en is daarom geen duurzame oplossing. De ontwikkeling van alternatieve strategieën om bacteriële infecties te bestrijden, is dringend nodig. Eén van de aspecten waarnaar er nog onvoldoende onderzoek is gebeurd, is de invasie van de pathogene bacteriën in aquacultuursystemen. Recent hebben verschillende onderzoekers hypothesen vooropgesteld die stellen dat de typische behandelingen in de aquacultuur, zoals sterilisatie van inkomend water, frequente voeding van de gecultiveerde organismen en toediening van voeding in de vorm van partikels waarschijnlijk een sterke invloed op deze invasie hebben. De doelstelling van deze thesis is om het invasiepotentieel van *Vibrio campbellii* LMG 21363, een garnaal pathogeen, te onderzoeken in relatie tot zulke aquacultuurpraktijken.

Het eerste doel van deze studie is het vooropgestelde modelsysteem, waarbij de invaderende pathogeen opgevolgd wordt door middel van een GFP-eiwit (Groen fluorescent proteïne), te valideren. Er zullen een reeks experimenten uitgevoerd worden waarbij de GFP-betrouwbaarheid onder verschillende nutriëntencondities en over de groeistadia van de pathogeen gekwantificeerd zullen worden.

Een tweede doel van deze studie zal zijn om het invasiepotentieel van de pathogeen op verschillende tijdstippen na een nutriëntenpuls te kwantificeren. Op deze manier wordt getracht inzicht te verkrijgen in het belang van de timing van introductie na een voedingsevent. Hiernaast zal ook het belang van de initiële fysiologie van de pathogeen bepaald worden.

Een derde doel zal zijn om het invasiepotentieel van *V. campbellii* in autochtone microbiële gemeenschappen, die reeds één of meerdere nutriëntenpulsen gekregen heeft, te kwantificeren.

Een laatste doel is om te evalueren of herhaaldelijke nutriëntenpulsen de aanwezigheid van *V. campbellii* kunnen verlengen in vergelijking met een eenmalige puls.

2 Materiaal en methoden

2.1 Technieken

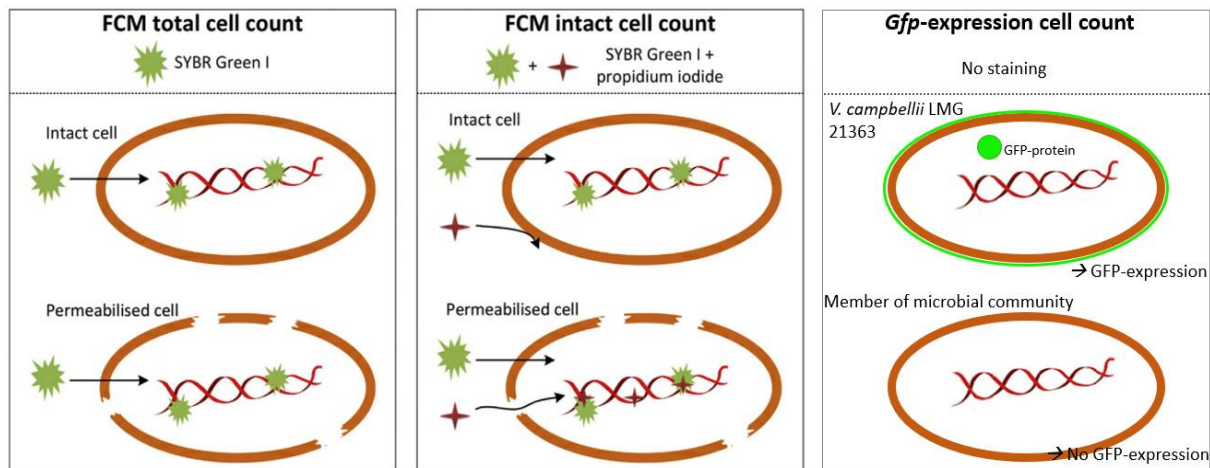
2.1.1 Bacteriële stam

Vibrio campbellii LMG 21363 werd gebruikt als model-invader. De bacteriële cultuur werd bewaard bij - 80°C. Voor de start van elk experiment werd de cultuur uitgeplaat op marine agar (Difco BD, België). Na 24 uur incubatie bij 28°C werd één enkele kolonie geïnoculeerd in vloeibaar medium, dewelke vervolgens gebruikt werd om de experimenten op te starten. *V. campbellii* LMG 21363 werd in eerder onderzoek reeds rifampicineresistent gemaakt (Phuoc et al., 2009) en werd later gelabeld met een GFP-eiwit, om de stam te kunnen opvolgen tijdens invasie-experimenten (Dantas-Lima et al., 2012). Deze merking werd uitgevoerd via een pJBA120 plasmide die een miniTn5-vector bevatte (Andersen et al., 1998), waardoor het *gfp* gen geassocieerd is met een kanamycine-resistentie. De kanamycine-resistentie is dus geassocieerd aan het *gfp* gen, terwijl rifampicine dit niet is. In deze studie werd dit GFP-eiwit gebruikt om de pathogeen op te volgen in gemengde microbiële gemeenschappen door middel van flow cytometrie.

2.1.2 Microbiële analyse

2.1.2.1 Flow cytometrie

Voor de flow cytometrische analyse werden de stalen verdund met 35 g/L IO (Instant Ocean®, Aquarium Systems, US) en gekleurd met nucleïnezuur kleurstoffen. De gebruikte kleurstoffen waren SYBR® Green I (SG, 100x concentraat in 0.22 µm-gefilterd dimethylsulfoxide, Invitrogen) voor de totale cel-analyse en SYBR® Green I gecombineerd met propidium jodide (SGPI, 100x concentraat in 0.22 µm-gefilterd dimethylsulfoxide, Invitrogen) voor analyse van intacte en beschadigde cellen (Figuur 8). Kleuring werd uitgevoerd zoals beschreven in Props et al. (2016) met incubatie gedurende 20 minuten bij 37°C in het donker. Stalen werden onmiddellijk na incubatie geanalyseerd. Het aantal GFP-positieve cellen werd zonder kleuring bepaald (Figuur 8). Aan de hand van de bepaling van het totaal aantal cellen en de GFP-positieve cellen, kon het percentage GFP-positieve cellen bepaald worden.



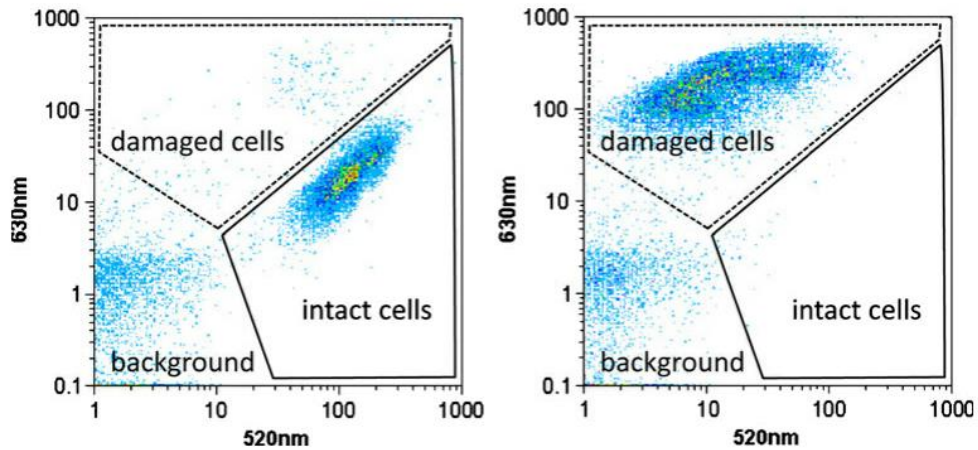
Figuur 8: Het principe van flow cytometrische bepaling van de totale celconcentratie, intacte celconcentratie en het aantal GFP-positieve cellen. De totale celconcentratie bepaling is gebaseerd op SYBR Green I die alle bacteriële cellen met nucleïnezuren binnendringt en kleurt onafhankelijk van de membraanintegriteit. De intacte celconcentratie bepaling is gebaseerd op een dubbele kleuring met zowel SYBR Green I als propidium jodide, waarbij propidium jodide alleen bacteriële cellen met beschadigde celmembranen kan binnendringen en kleuren. Hierdoor kan er onderscheid gemaakt worden tussen bacteriële cellen met intacte membranen (met SYBR Green gekleurd) en beschadigde (met SYBR Green en propidium jodide gekleurd) bacteriële cellen. Om de abundantie van GFP-positieve cellen en dus *V. campbellii* te bepalen wordt gebruik gemaakt van zijn GFP-expressie. Hierbij moet het staal niet gekleurd worden. Het aantal GFP-positieve cellen is het aantal cellen van de invader (herwerkt uit Van Nevel et al., 2017).

In deze studie werden drie flow cytometers (Accuri™ C6, Accuri™ C6+ en Attune™ Nxt) gebruikt. De GFP-betrouwbaarheidstesten werden uitgevoerd op de Accuri™ C6 en C6+ flow cytometers en de invasie-experimenten op de Attune™ Nxt flow cytometer. De C6 Accuri™ en de Accuri™ C6+ flow cytometer (BD Biosciences, België) waren uitgerust met vier fluorescentiedetectoren (530/30 nm, 585/40 nm, > 670 nm en 675/25 nm), twee scatter-detectoren en een 20-mW 488-nm laser. Milli-Q (MerckMillipore, België) werd gebruikt als sheath vloeistof.

De Attune™ Nxt Flow cytometer (ThermoFisher, België) was uitgerust met een 100-mW blauwe (488 nm) en 140-mW rode (637 nm) laser en met 6 fluorescentie-detectoren (530/30, 574/26, 695/40, 780/60, 670/14, 720/30, 780/60) en twee scatter-detectoren. Attune™ focusing fluid (ThermoFisher, België) werd gebruikt als sheath vloeistof en de performantie van het instrument werd dagelijks geïmporteerd met Attune™ Performance Tracking Beads (ThermoFisher, België).

2.1.2.2 Data analyse

De fcs-bestanden (flow cytometric standard) werden geïmporteerd in R (v3.3.1) (R Core team, 2008) met behulp van het flowCore-pakket (v1.40.3) (Le Meur et al., 2019). De achtergrond van de fingerprints werd verwijderd door handmatig gates te kiezen op de primaire fluorescerende kanalen (Figuur 9). Voor elk experiment werd een geschikte gate gemaakt.



Figuur 9: Voorbeeld van een flow cytometrische plot met handmatig gekozen gates. Gating werd in dit voorbeeld toegepast om de intacte cellen, de beschadigde cellen en de achtergrond van elkaar te onderscheiden (Hammes & Egli, 2010).

2.2 Experimentele setups

2.2.1 Experiment 1: GFP-betrouwbaarheid

Voor de start van de invasie-experimenten werd het modelsysteem gevalideerd. De GFP-expressie van *V. campbellii* zou gebruikt worden voor de kwantificatie van de invader in de microbiële gemeenschap. Met behulp van enkele experimenten werd bepaald of deze GFP-expressie betrouwbaar en stabiel was onder verschillende nutriëntencondities, dewelke relevant waren voor de vooropgestelde experimentele setups. De GFP-expressie werd getest in functie van de tijd, over de verschillende groeifasen en onder competitie met een gemengde microbiële gemeenschap. Bij al deze experimenten werd *V. campbellii* opgegroeid in steriel medium zonder en met antibiotica (50 mg/L kanamycine). De conditie met antibiotica diende als positieve controle, waarbij er geen afname van GFP-expressie werd verwacht, gezien de associatie tussen het GFP-eiwit en de kanamycine-resistentie (§ 2.1.1). Bij de conditie zonder antibiotica werd nagegaan of *V. campbellii* het GFP-eiwit zou blijven produceren na meerdere generaties bij de afwezigheid van kanamycine.

2.2.1.1 GFP-betrouwbaarheid over de tijd

Het doel van deze test was om na te gaan of *V. campbellii* zijn GFP-expressie zou verliezen over de tijd. Er werd voedingsrijk (marine broth) en voedingsarm medium (10x en 100x verdund marine broth) aangemaakt. Aangezien marine broth 35 g/L zout bevat, werd het zoutgehalte in de verdunde media gecompenseerd zodat er 35 g/L zout aanwezig was in alle media. De stabiliteit van het GFP werd bepaald onder verschillende nutriëntencondities om na te gaan of *V. campbellii* onder stresscondities (door nutriënten-schaarste) de productie van het GFP zou aanpassen.

V. campbellii werd opgegroeid in triplicaat in steriel medium (5 mL) zonder en met antibiotica (50 mg/L kanamycine) bij 28°C met shaking (60 rpm). Er werd een negatieve controle met steriel medium gebruikt om te controleren op contaminatie. Elke 24 uur werden de culturen 100-maal verdund in vers medium om de actieve groei en zo ook het maximaal aantal generatietijden te verzekeren. De culturen werden geïncubeerd bij 28°C met shaking (60 rpm). Bij elke transfer werd een staal genomen voor flow cytometrische analyse. Het totaal aantal cellen, de beschadigde cellen en de GFP-positieve cellen werden bepaald met flow cytometrie. Dit experiment werd over een periode van 7 dagen uitgevoerd.

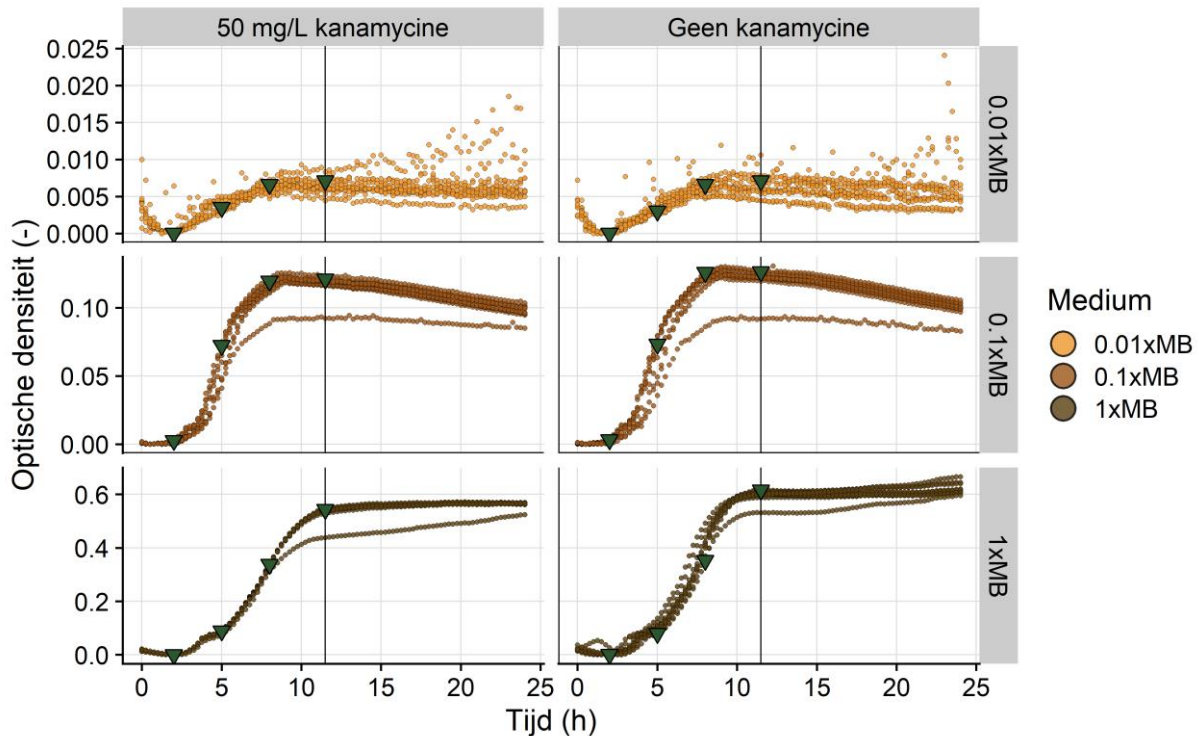
2.2.1.2 GFP-betrouwbaarheid over de groeicurve

Het doel van deze test was om na te gaan of de GFP-expressie varieerde over de verschillende groeistadia. Tijdens de invasie-experimenten werd er gebruik gemaakt van nutriëntenpulsen. Daarom was het ook belangrijk om de GFP-betrouwbaarheid over de groeistadia te kwantificeren. Voor de start van het experiment werd de groeicurve van *V. campbellii* opgesteld op basis van optische densiteit (OD) metingen. Zoals hierboven beschreven werden drie verschillende media aangemaakt (50 mL; marine broth 1x, 10x en 100x verdund). Vervolgens werd *V. campbellii* opgegroeid en geïnculeerd in steriel medium (5 mL) zonder en met antibiotica (50 mg/L kanamycine).

Na 24 uur incubatie bij 28°C werd de celdensiteit in de culturen bepaald door flow cytometrie. De culturen werden verdund tot een densiteit van 10^6 cellen/mL in steriel medium. Een 96-well plaat werd gevuld met 10 replicaten per cultuur om de groeicurve op te starten (200 μ L per well). De buitenrand van de 96-well plaat werd gevuld met 0.2 μ m gefilterd gedemineraliseerd water om verdamping van de stalen te reduceren (300 μ L per well). De OD bij 600 nm werd gemeten met behulp van een Tecan Infinite[®] M200 PRO multiwell-plaatlezer (Tecan Trading AG, Zwitserland) met tijdsintervallen van 15 minuten over een totale periode van 24 uur. De temperatuur werd ingesteld op 28°C.

Gebaseerd op de bekomen groeicurve, werden vier tijdstippen bepaald overeenstemmend met de lag fase, de log of exponentiële fase, de vroege stationaire fase en de stationaire fase (Figuur 10). De vier tijdstippen waren 2, 5, 8 en 11.5 uur na inoculatie. Voor de start van het experiment werd *V. campbellii* opnieuw opgegroeid en geïnculeerd aan een startconcentratie van 10^6 cellen/mL in de drie media, op dezelfde manier als hierboven beschreven. Op de vier tijdstippen werden stalen genomen voor flow cytometrische analyse, waarbij het totaal aantal cellen en de GFP-positieve cellen werden bepaald door flow cytometrie. Naast deze vier tijdstippen op de groeicurve, werden ook na 26, 32, 52 en 122 uur stalen genomen om de GFP-betrouwbaarheid in de laat stationaire fase te onderzoeken. Voor deze stalen werden telkens het totaal aantal cellen, de GFP-positieve cellen en het aantal intacte/beschadigde cellen bepaald. Het experiment werd uitgevoerd in biologische triplicaten. Ter controle werd tijdens het experiment ook een groeicurve opgesteld op basis van de OD-metingen (Extra

figuur 2). De groeicurven verliepen gelijkaardig in vergelijking met deze opgesteld tijdens de preliminaire test.

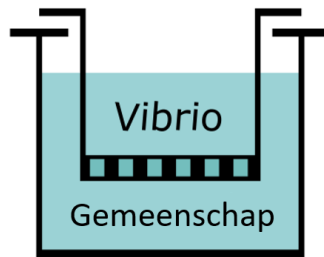


Figuur 10: Preliminaire groeicurven van *V. campbellii* in de drie verschillende media en in aan- en afwezigheid van kanamycine. De groene driehoeken duiden de vier gekozen tijdstippen aan waarop tijdens het experiment stalen voor flow cytometrie genomen werden en stemden overeen met de lag fase, de exponentiële fase, de vroege stationaire fase en de stationaire fase. De verticale lijn geeft weer wanneer alle culturen zich in stationaire fase bevonden ($t = 11.5\text{h}$). Er waren biologische replicaten voor elke conditie ($n = 10$).

2.2.1.3 GFP-betrouwbaarheid in gemengde gemeenschappen

Om na te gaan of de GFP-expressie varieerde wanneer *V. campbellii* interageerde/concurreerde met een gemengde gemeenschap werd een experiment met een co-cultuur setup uitgevoerd. Er werd gebruik gemaakt van Transwell-platen (Costar 6-well celkweekplaten, Corning, Inc.), waar apicale en basale compartimenten werden gecreëerd met behulp van cocultuur-inzetstukken (ThinCert cocultuur-inzetstukken met poriediameters van $0.4\ \mu\text{m}$; Greiner Bio-One) (Figuur 11). De membranen van de cocultuur-inzetstukken werden vervangen door membranen met kleinere poriegroottes om migratie van bacteriën tussen de twee compartimenten (Whatman Cyclopore polycarbonaat en polyestermembranen met $0.2\ \mu\text{m}$ poriegrootte; GE Life Sciences) te voorkomen. Het membraan laat toe om nutriënten en metabolieten tussen de twee compartimenten te transfereren zodat de invader met de gemeenschap kan interageren en laat tegelijkertijd toe om de *V. campbellii* populatie individueel te bestuderen. Er werden drie verschillende autochtone gemeenschappen gekozen, namelijk zeewater, water uit een cultivatietank voor garnalen (*Litopenaeus vannamei*) en water uit een biofilter dat deel uit maakt van een recirculatiesysteem waarin

garnalen (*L. vannamei*) gekweekt worden. De reden voor het gebruik van verschillende gemeenschappen is om de generaliseerbaarheid van de resultaten te kunnen nagaan.



Figuur 11: Co-cultuur opstelling waarbij *V. campbellii* LMG 21363 werd toegevoegd in het apicale compartiment en de gemengde gemeenschap in het basale compartiment.

Voor de start van het experiment werd *V. campbellii* opgegroeid in 100x verdund marine broth (50 mL) en 24 uur geïncubeerd bij 28°C. Voor het vullen van de 6-well platen werden de celdensiteiten van de gemeenschappen en de *V. campbellii* LMG 21 363 cultuur bepaald met flow cytometrie. Vervolgens werden deze verdund tot 10⁵ cellen/mL in vers 100x verdund marine broth. In het apicale compartiment werd 2 mL van de *V. campbellii* cultuur toegevoegd. In het basale compartiment werd 4 mL van één van de gemeenschappen toegevoegd. Het experiment werd in duplicaat uitgevoerd en de condities werden gerandomiseerd over de platen om plaat effecten te vermijden. Een *V. campbellii* cultuur met steriel medium in plaats van een autochtone gemeenschap in het basale compartiment werd gebruikt als controle, met en zonder antibiotica (50 mg/L kanamycine). Op elke plaat was ook een controle met steriel medium aanwezig om te controleren op crosscontaminatie.

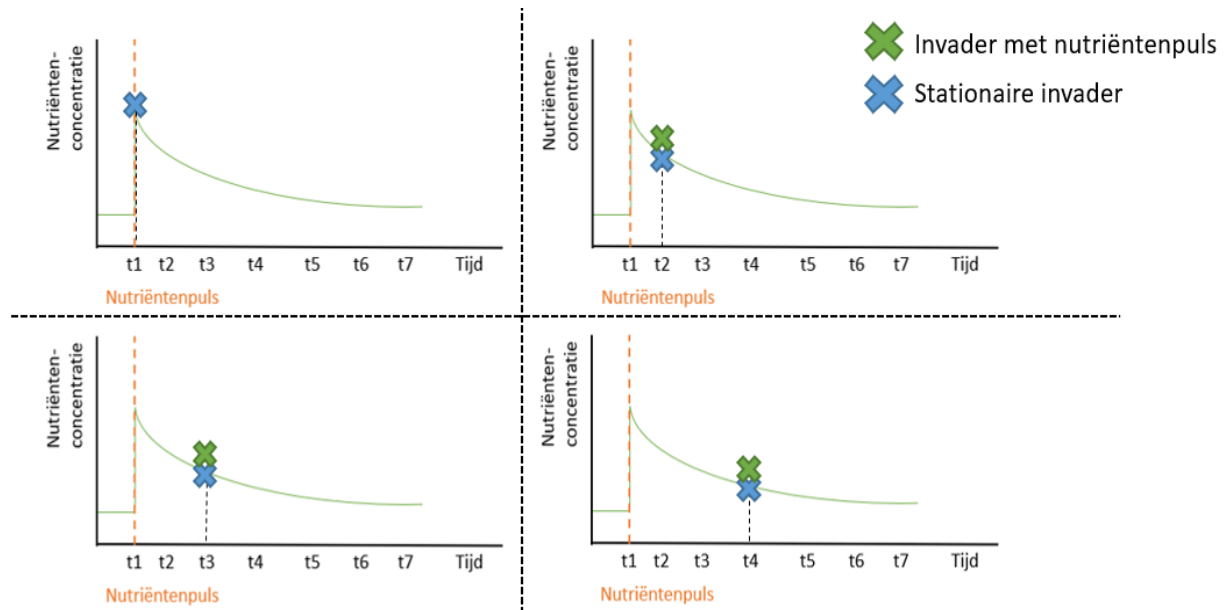
De gemeenschappen werden gedurende 72 uur geïncubeerd bij 28°C waarbij de platen voorzichtig geschud werden (25 rpm) om diffusie van metabolieten tussen de compartimenten te bevorderen. Elke 24 uur werden stalen genomen en geanalyseerd met flow cytometrie om het totaal aantal cellen, de beschadigde cellen en de GFP-positieve cellen te bepalen.

2.2.2 Experiment 2: Invasie na nutriëntenpulsen en het belang van invader fysiologie

Nutriëntenpulsen zijn typisch in aquacultuursystemen omwille van de nood aan frequente voeding van de gecultiveerde dieren. Het doel van dit experiment was om het invasiepotentieel van *V. campbellii* in een gemengde gemeenschap op verschillende tijdstippen na een nutriëntenpuls te kwantificeren. Hiertoe kreeg de gemengde gemeenschap, afkomstig van een aquacultuursysteem (water uit een biofilter dat deel uitmaakt van een recirculatiesysteem waarin garnalen (*L. vannamei*) gekweekt worden), een nutriëntenpuls en werd deze vervolgens geïnvadeerd door *V. campbellii* op één van de vier geselecteerde tijdstippen (Figuur 12). De vier gekozen tijdstippen voor invasie waren; t1 = tegelijkertijd met de nutriëntenpuls; t2 = wanneer de gemeenschap de nutriënten is gaan verbruiken, maar het grootste deel ervan nog steeds beschikbaar is; t3 = wanneer de gemeenschap naar

verwachting al een groot deel van de nutriënten heeft verbruikt en sterk groeit; t4 = na het bereiken van de stationaire fase.

Het experiment werd ook uitgevoerd in parallel met een tweede invader. Dit was *V. campbellii*, die op hetzelfde tijdstip als de gemeenschappen eenzelfde nutriëntenpuls toegediend kreeg. Op deze manier groeide deze invader actief, terwijl de andere invader reeds in stationaire fase was. Het doel hiervan was om na te gaan of de initiële fysiologie van de invader een invloed had op het invasiepotentieel.



Figuur 12: Visualisatie van de opzet van experiment 2, waarbij de vier verschillende condities worden getoond. Alle gemeenschappen ontvingen een nutriëntenpuls op t1 en er werd steeds op een ander tijdstip geïnvadeerd en dit door zowel een invader die ook een nutriëntenpuls ontvangen had, als door een invader die in stationaire fase was. Met uitzondering bij tijdstip t1 waarbij enkel invasie met de stationaire invader werd uitgevoerd. De gekozen tijdstippen zijn op basis van de preliminaire groeicurven van de gemengde gemeenschap en *V. campbellii* LMG 21363 (Extra figuur 7 en Extra figuur 8) (t1 = 0h, t2 = 3h, t3 = 8h, t4 = 12h, t5 = 24h, t6 = 36h, t7 = 48h).

Voor de start van het experiment werd *V. campbellii* opgegroeid in LB/100 + 35g/L IO (LB: Lysogeny broth) (50 mL). De gemengde gemeenschap werd hiertoe 10x verdund in duplicaat in LB/100 + 35g/L IO (50 mL). Op deze manier werd de gemeenschap reeds geadapteerd aan dezelfde nutriënten waarin de invader opgegroeid werd en dewelke ook gebruikt werd om tijdens het experiment de nutriëntenpuls te geven. De invader en de gemengde gemeenschap werden 24 uur geïncubeerd bij 28°C. Bij de start van het experiment werd de gemengde gemeenschap cultuur verdeeld over 12-well platen (2 mL per well) in biologische triplicaten per conditie. Naast de 8 gemeenschappen (4 invasietijdstippen, 2 verschillende invaders) werden ook de gemeenschap zonder invader en de invader alleen in de 12-well platen verdeeld, ter controle. De condities werden gerandomiseerd over de platen om plaat-effecten in de resultaten te vermijden. Elke plaat bevatte een well met steriel medium ter controle voor crosscontaminatie. De platen werden tijdens het experiment bewaard in een 28°C incubator met shaking (60 rpm) om de nutriënten zo homogeen mogelijk te verdelen.

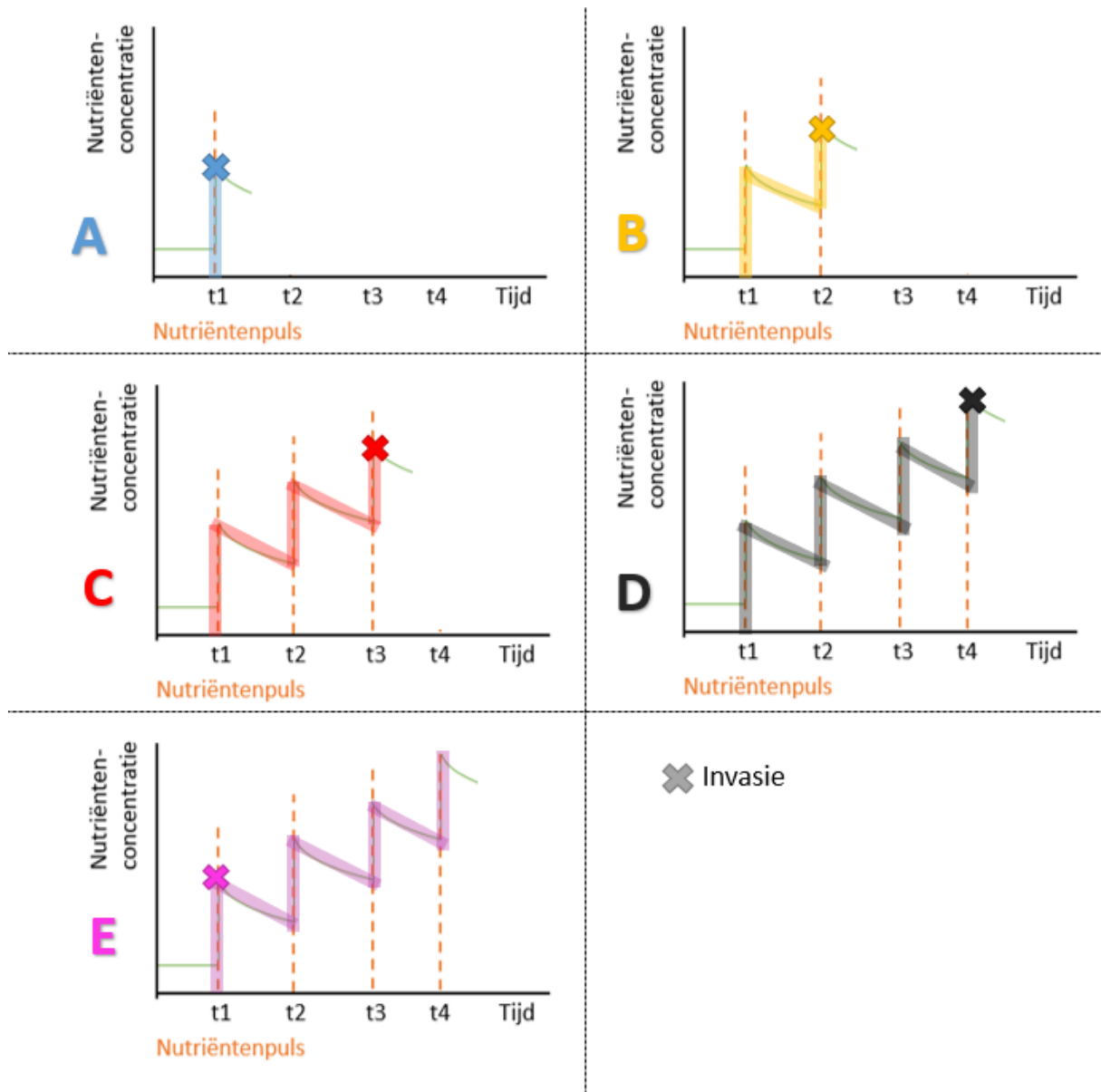
Elke gemeenschap kreeg een nutriëntenpuls van 1.0 mg/mL LB (5.55 maal groter dan de reeds aanwezige nutriënten). Voor de invasiepuls werd op elk van de vier tijdstippen de celdensiteit van de invader bepaald met flow cytometrie. Ook werd de hoeveelheid cultuur die nodig was om een invasie uit te voeren met 10^6 invader cellen/mL bepaald. Voor elk volgend invasie-event werden het totaal aantal cellen en de GFP-positieve cellen in elke gemeenschap bepaald met behulp van flow cytometrie. Verder werden ook op 24, 32 en 48 uur na de eerste invasie dezelfde parameters bepaald met flow cytometrie. De flow cytometrische metingen werden uitgevoerd in technische triplicaten.

In parallel werd als controle de OD bij 600 nm gemeten met behulp van een Tecan Infinite[®] M200 PRO multiwell-plaatlezer (Tecan Trading AG, Zwitserland) met tijdsintervallen van 15 minuten over een totale periode van 72 uur. De temperatuur werd ingesteld op 28°C.

2.2.3 Experiment 3: Invasie na herhaaldelijke nutriëntenpulsen

In de praktijk wordt voeding meermaals per dag toegediend in garnaalkwekerijen. Dit experiment werd uitgevoerd om na te gaan of gemeenschappen die reeds herhaaldelijke nutriëntenpulsen ontvangen hadden voor de invasie meer of minder invasieresistent waren in vergelijking met gemeenschappen die nog geen eerdere nutriëntenpuls ontvangen hadden. Hiernaast werd nagegaan of herhaaldelijke nutriëntenpulsen na de invasie de aanwezigheid van *V. campbellii* in de autochtone gemeenschap kon verlengen in vergelijking met een eenmalige puls.

De gemeenschap en de *V. campbellii* cultuur werden op dezelfde manier voorbereid zoals beschreven in het vorige experiment. Op basis van preliminaire testen werd gekozen voor het toedienen van een nutriëntenpuls elke 3 uur (Extra figuur 9, Extra figuur 10 en Extra figuur 11). Hiernaast werd er ook voor gekozen om de helft minder nutriënten toe te dienen per puls in vergelijking met het vorige experiment en dit om ervoor te zorgen dat de bacteriële densiteit niet te hoog zou worden tijdens het experiment. Er werden vijf verschillende condities getest met een verschillende nutriëntenpulsfrequentie en invasie timing (Figuur 13). Conditie A, B, C en D werden met elkaar vergeleken om na te gaan of de gemeenschap meer of minder invasieresistent was na het verkrijgen van herhaaldelijke nutriëntenpulsen voor de invasie. Conditie A en E werden met elkaar vergeleken om na te gaan of herhaaldelijke nutriëntenpulsen na de invasie de aanwezigheid van *V. campbellii* in de autochtone gemeenschap kon verlengen.



Figuur 13: De vijf geteste condities, die elk een andere combinatie hebben van invasie timing en nutriëntenpulsfrequentie. Conditie A, B, C en D werden met elkaar vergeleken om na te gaan of de gemeenschap meer of minder invasieresistent was na het verkrijgen van herhaaldelijke nutriëntenpulsen voor de invasie. Conditie A en E werden met elkaar vergeleken om na te gaan of herhaaldelijke nutriëntenpulsen na de invasie de aanwezigheid van *V. campbellii* in de autochtone gemeenschap kon verlengen.

De verschillende condities werden gemaakt in 24-well platen (2 mL per well) in biologische triplicaten per conditie. De replicaten werden gerandomiseerd over de platen om plaat-effecten in de resultaten te vermijden. Voor elke invasie en nutriëntenpuls werden stalen genomen en geanalyseerd via flow cytometrie en het totaal aantal cellen en het aantal GFP-positieve cellen werden bepaald. De celdensiteit van de *V. campbellii* cultuur werd voor de initiële invasie bepaald door flow cytometrie. Ook de hoeveelheid volume die nodig was om een invasie uit te voeren van 10^6 cellen/mL werd bepaald. De nutriëntenpuls die toegediend werd was 0.5 mg/mL LB (2.775 maal groter dan de reeds aanwezige nutriënten). Tussen elk tijdspunt

werden de platen bewaard in een 28°C incubator met shaking (60 rpm) om de nutriënten zo homogeen mogelijk te verdelen.

In parallel werd als controle de optische dichtheid (OD) bij 600 nm gemeten met behulp van een Tecan Infinite® M200 PRO multiwell-plaatlezer (Tecan Trading AG, Zwitserland) met tijdsintervallen van 5 minuten over een totale periode van 49 uur. De temperatuur werd ingesteld op 28°C.

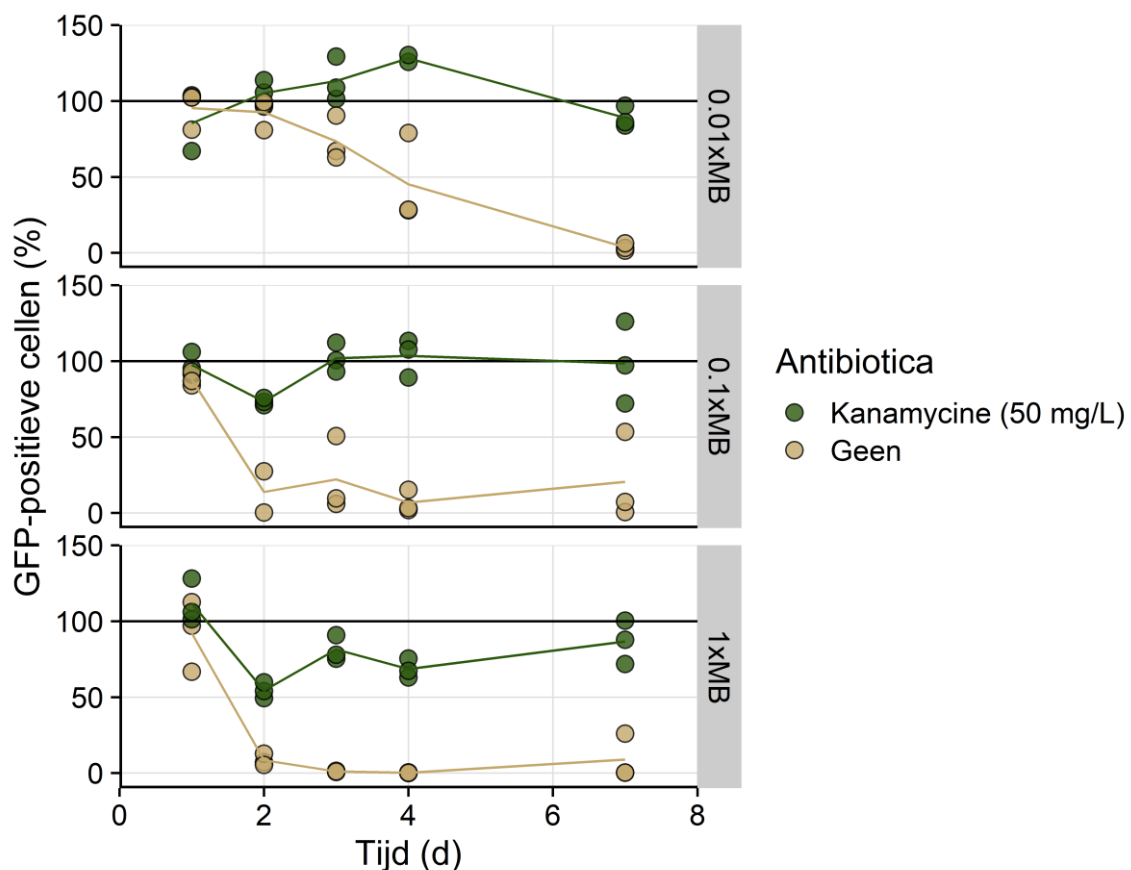
3 Resultaten

3.1 Experiment 1: Validatie van het modelsysteem

In het vooropgestelde invasiemodel werd de invaderende pathogeen, *V. campbellii* LMG 21363, opgevolgd in gemengde microbiële gemeenschappen door middel van een GFP-eiwit, hetgeen te detecteren was met behulp van flow cytometrie. De GFP-expressie kan echter afhankelijk zijn van de milieucondities waarin het organisme zich bevindt. Aan de hand van drie experimenten werd bepaald of de expressie betrouwbaar en stabiel was onder de experimentele condities die in deze studie gebruikt werden. De GFP-expressie werd getest in functie van de tijd, over de groeicurve van *V. campbellii* en in relatie met een gemengde microbiële gemeenschap.

3.1.1 GFP-betrouwbaarheid over de tijd

Met dit experiment werd nagegaan of de GFP-expressie verloren ging over de tijd. Hierbij werden over een periode van zeven dagen elke 24 uur de culturen 100-maal verdund in vers medium. De media met kanamycine dienden als positieve controles door de associatie van het GFP-eiwit met kanamycine-resistentie.



Figuur 14: Het percentage van GFP-positieve cellen in functie van de tijd, in de aan- en afwezigheid van kanamycine, onder de verschillende nutriëntencondities. Er waren biologische replicaten voor elke conditie (n = 3). De lijnen geven de gemiddelde trend van de replicaten aan.

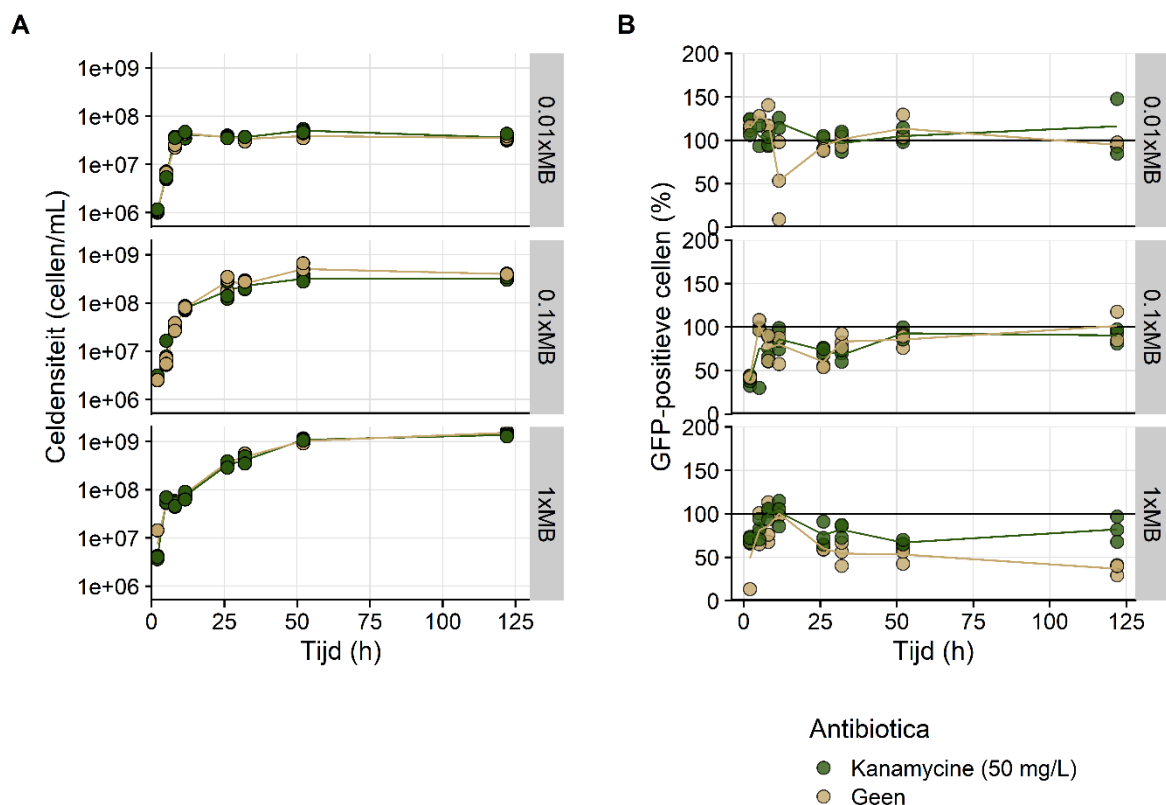
Bij de stalen zonder kanamycine was er een algemene neerwaartse trend op te merken bij alle nutriëntenconcentraties over de zeven dagen (Figuur 14). Bij de stalen met kanamycine bleef de GFP-expressie aanwezig (50 - 100 % GFP-positieve cellen).

Indien de verschillende nutriëntenconcentraties bij de stalen zonder kanamycine vergeleken werden, was er duidelijk een veel snellere neerwaartse trend bij de rijkere media in vergelijking met het armere medium. In het 0.01 x MB medium werd het GFP-sigitaal na vier dagen gemiddeld lager dan 50 % en ging het pas na zeven dagen helemaal verloren, terwijl dit bij de rijkere media (0.1 x MB en 1 x MB) al na twee dagen het geval was.

Indien de totale celdensiteiten nader bekeken werden, werd er opgemerkt dat er nagenoeg geen verschil was tussen de conditie met antibiotica en zonder (Extra figuur 1). Tussen de verschillende media was er wel een duidelijk verschil op te merken. In het 0.01 x MB medium bereikte de stam elke dag een gemiddelde celdensiteit van $3.8 \times \pm 5.5 \times 10^7$ cellen/mL. In het 0.1 x MB medium was dit $2.7 \pm 1.1 \times 10^8$ cellen/mL en in het 1 x MB medium bereikte de stam een celdensiteit van $6.3 \pm 2.2 \times 10^8$ cellen/mL. Deze steeds hoge celdensiteiten liggen in de verwachtingen aangezien de stam zich steeds in stationaire fase bevond na 24 uur en er dus verwacht werd dat de meeste nutriënten omgezet werden naar biomassa. Het percentage intacte cellen voor alle media, in de aan- en afwezigheid van kanamycine was elke dag zeer hoog met een gemiddelde van 96.9 ± 2.3 % (Extra figuur 1).

3.1.2 GFP-betrouwbaarheid over de groeicurve van *V. campbellii* LMG 21363

Met dit experiment werd getracht aan te tonen of de intensiteit van het GFP-sigitaal afwijkt over de verschillende groeifasen. Een preliminaire groeicurve van *V. campbellii* werd opgesteld, waarna er vier tijdstippen werden gekozen overeenstemmend met de verschillende groeifasen (Figuur 10).



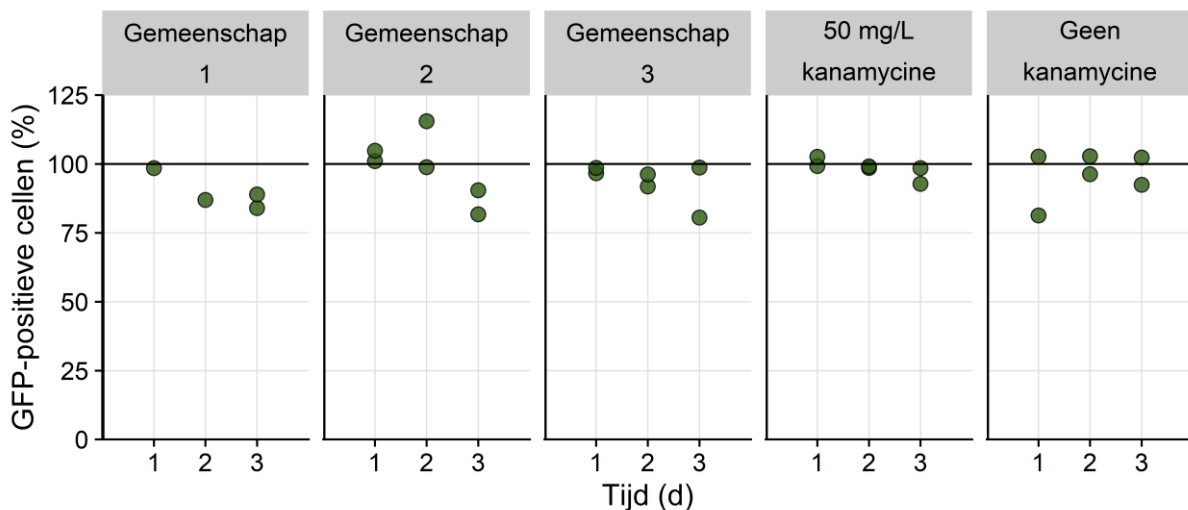
Figuur 15: De totale celdensiteit (A) en het percentage GFP-positieve cellen (B) in functie van de tijd, in de aan- en afwezigheid van kanamycine, onder de verschillende nutriëntencondities. De gemeten punten werden zo gekozen dat het de groeifasen van *V. campbellii* LMG 21363 omvatte. Er waren biologische replicaten voor elke conditie (n = 3). De lijnen geven de gemiddelde trend van de replicaten aan.

Over de gehele groeicurve van *V. campbellii* was er steeds een hoge GFP-expressie op te merken voor alle nutriëntenconcentraties (Figuur 15B). Na 11.5 uur daalde de GFP-expressie in het rijkste medium (1 x MB), terwijl in de andere media de GFP-expressie steeds hoog bleef, wat een bevestiging was van de resultaten van de vorige sectie. In de media 0.01 x MB en 0.1 x MB was er bijna geen verschil op te merken tussen de aan- of afwezigheid van kanamycine, op één replicaat in het 0.01 x MB medium na. In het 1 x MB medium daalde de conditie zonder kanamycine tot gemiddeld 36.8 ± 6.3 % terwijl de conditie met kanamycine gemiddeld 82.2 ± 14.6 % was.

De celdensiteiten van alle media hadden een gelijkaardig stijgende trend (Figuur 15A). In het 0.01 x MB medium bereikte *V. campbellii* zijn maximale celdensiteit van $4.3 \pm 0.4 \times 10^7$ cellen/mL na 11.5 uur, waarna het constant bleef. In het 0.1 x MB medium bereikte *V. campbellii* zijn maximale celdensiteit van $4.1 \pm 1.5 \times 10^8$ cellen/mL na 52 uur, waarna het constant bleef. In het 1 x MB medium bereikte *V. campbellii* de maximale celdensiteit van $1.1 \pm 0.09 \times 10^9$ cellen/mL na 50 uur, waarna het ook constant bleef. Tijdens de groei waren er geen verschillen tussen de condities met en zonder antibiotica.

3.1.3 GFP-betrouwbaarheid wanneer *V. campbellii* LMG 21363 interageert met een gemende gemeenschap

Wanneer de invader concurreert en interageert met een microbiële gemeenschap, zal hij zijn genexpressie aanpassen. Met dit experiment werd gekwantificeerd wat het effect van de aanwezigheid van een gemengde gemeenschap was op de GFP-expressie van *V. campbellii*. Het experiment werd uitgevoerd in een co-cultuur setup waarbij twee compartimenten werden aangemaakt, één voor de invader en één voor de gemeenschap. Deze setup liet toe om nutriënten en metabolieten tussen de twee compartimenten te transfereren. Hierbij werd slechts gebruik gemaakt van één medium, namelijk 0.01 x MB, omdat de vorige experimenten hadden aangetoond dat de GFP-expressie in dit medium het langst stabiel bleef en dus het meest betrouwbaar was. Er werden drie gemeenschappen getest en de reden hiervoor was om de generaliseerbaarheid van de resultaten na te kunnen gaan.



Figuur 16: Het percentage GFP-positieve cellen in functie van de tijd en onderverdeeld over de verschillende geteste condities. Er waren duplicaten voor elke conditie ($n = 2$).

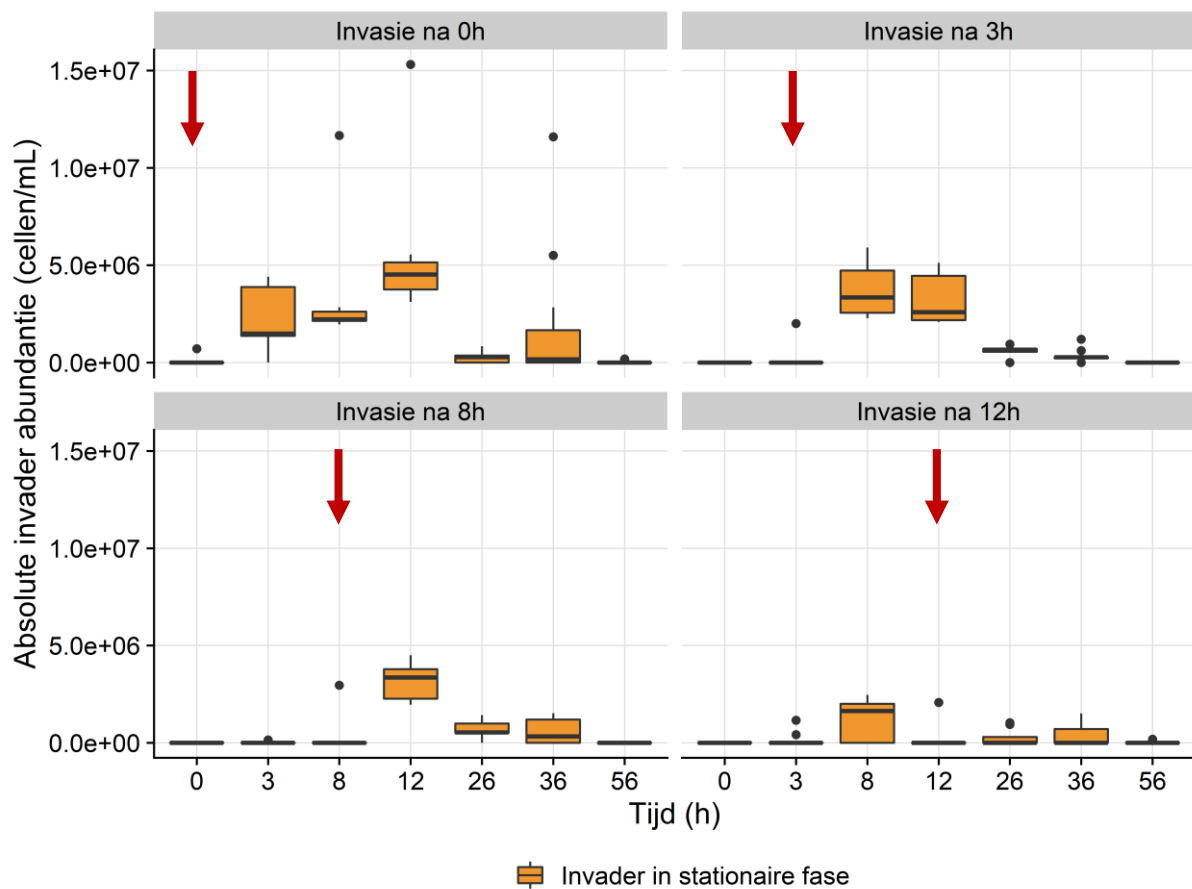
In de drie geteste gemeenschappen daalde de GFP-expressie volgens een gelijkaardig neerwaartse trend over de drie dagen (Figuur 16). Na drie dagen was de GFP-expressie gedaald van 100 % naar gemiddeld 87.4 ± 6.8 %. Wanneer *V. campbellii* zich in een gemengde cultuur bevond, was er duidelijk een sterkere neerwaartse trend ten opzichte van de axenische cultuur. Hierbij daalde de GFP-expressie in de axenische cultuur tot gemiddeld 96.5 ± 4.8 %. Tussen de drie geteste gemeenschappen waren er geen significante verschillen ($p > 0.05$).

Als conclusie kon gesteld worden dat de GFP-expressie over de verschillende GFP-betrouwbaarheidstesten het minst lang stabiel bleef in het rijkste medium (1 x MB) en bij de afwezigheid van kanamycine. De GFP-expressie daalde ook wanneer *V. campbellii* interageerde met een autochtone gemeenschap.

3.2 Experiment 2: Invasie na nutriëntenpulsen

3.2.1 Belang van de timing van introductie van een invader na een nutriëntenpuls

In typische aquacultuursystemen moeten de gecultiveerde organismen meerdere malen per dag gevoederd worden. Tijdens zo een voedingsevent wordt er een grote hoeveelheid nutriënten in het water gebracht. Met dit experiment werd het invasiepotentieel van *V. campbellii* LMG 21363 gekwantificeerd op verschillende tijds punten na toevoeging van een nutriëntenpuls.

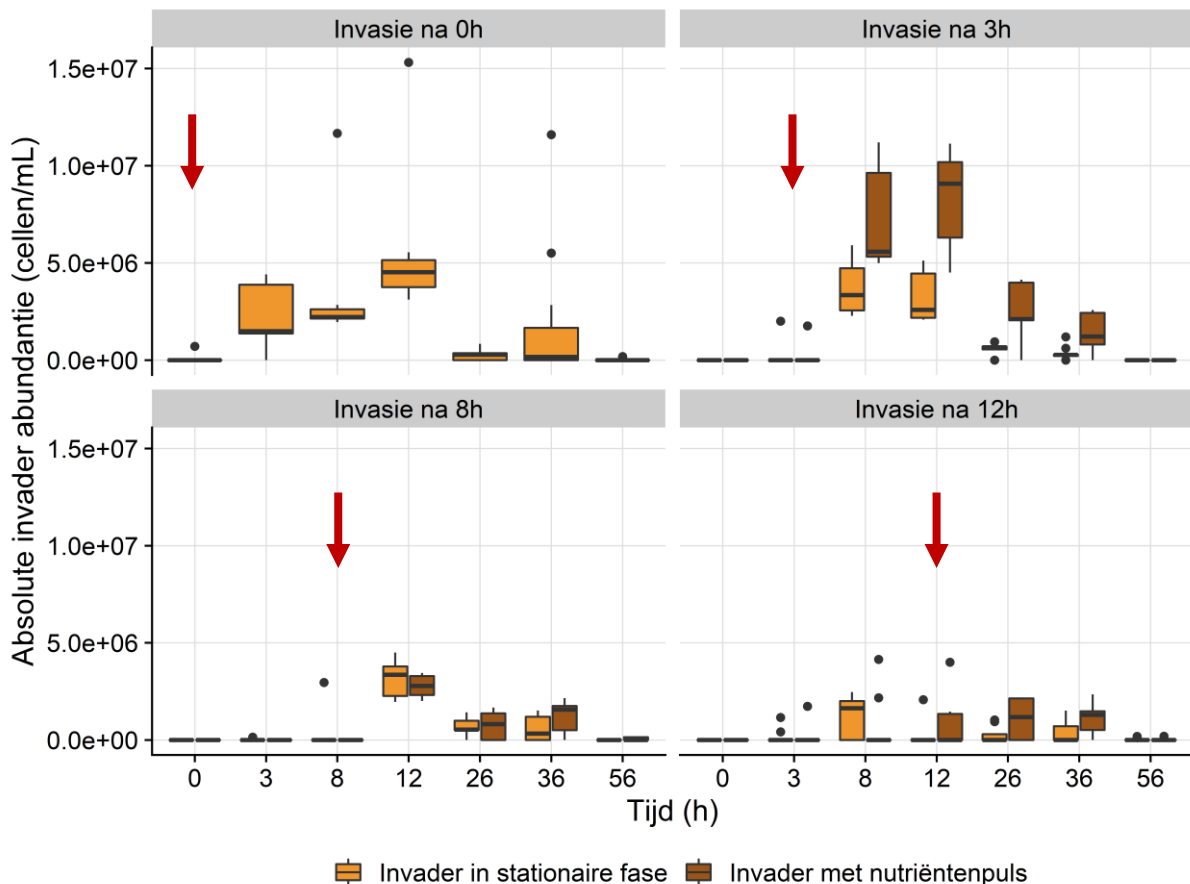


Figuur 17: Absolute invader abundantie over de tijd bij vier verschillende invasietijds punten ($t_1 = 0h$, $t_2 = 3h$, $t_3 = 8h$, $t_4 = 12h$ na de initiële nutriëntenpuls). Er waren technische ($n = 3$) en biologische ($n = 3$) replicaten per conditie. De rode pijlen duiden de timing van invasie aan.

De verschillende invasietijds punten resulteerden steeds in verschillende patronen van invader abundantie (Figuur 17). Bij invasietijds punt 1 (i.e. invasie tegelijkertijd met de nutriëntenpuls) werd geobserveerd dat de invader uitgroeide tot een maximale abundantie van $5.2 \pm 3.3 \times 10^6$ cellen/mL, 12 uur na de invasie. De abundantie daalde geleidelijk en 14 uur later werd het minimum van $4.3 \pm 2.3 \times 10^5$ cellen/mL bekomen, waarna het constant bleef op dit niveau tot het einde van het experiment.

Bij invasietijdstip 2 groeide de invader uit tot een maximale abundantie van $3.7 \pm 1.3 \times 10^6$ cellen/mL, 5 uur na de invasie. Deze abundantie bleef constant over de volgende 4 uur, waarna het daalde tot $6.9 \pm 1.5 \times 10^5$ cellen/mL, 14 uur later. Bij het derde invasietijdstip was er een gelijkaardig verloop op te merken zoals bij invasietijdstip 2, een snelle groei tot een maximale dichtheid en daarna een daling in abundantie. In dit geval groeide de invader na 4 uur uit tot een maximale abundantie van $3.1 \pm 0.9 \times 10^6$ cellen/mL, waarna deze daalde tot een abundantie van $8.9 \pm 3.9 \times 10^5$ cellen/mL, 14 uur later. De invader bleef de volgende 10 uur nog aanwezig in deze abundantie. Het laatste invasietijdstip 4 toonde een zeer geringe groei van de invader na de invasie. 14 uur na de initiële invasie groeide het maar uit tot een abundantie van $6.4 \pm 4.0 \times 10^5$ cellen/mL. Aangezien de invader werd toegediend aan een dichtheid van 1.0×10^6 cellen/mL was er bij invasietijdstip 4 geen groei, maar enkel een afname. De invader bleef in de gemeenschap met een gemiddelde abundantie van $6.6 \pm 6.2 \times 10^5$ cellen/mL tot het einde van het experiment.

3.2.2 Belang van invader fysiologie



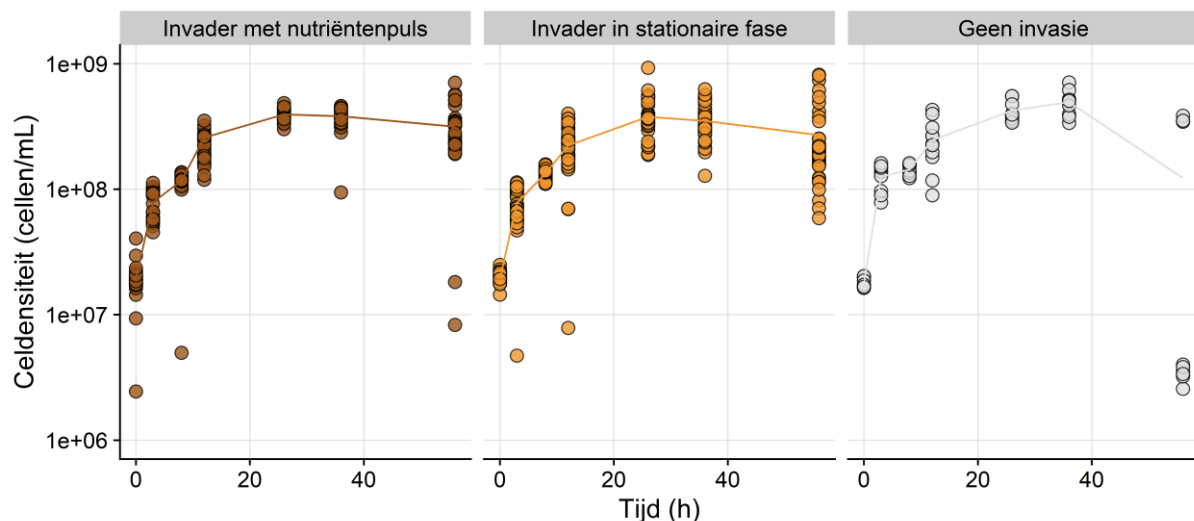
Figuur 18: Absolute invader abundantie van de stationaire invader en de invader met nutriëntenpuls over de tijd bij vier verschillende invasietijdstippen ($t_1 = 0h$, $t_2 = 3h$, $t_3 = 8h$, $t_4 = 12h$ na de initiële nutriëntenpuls). Er waren technische ($n = 3$) en biologische ($n = 3$) replicaten per conditie. De rode pijlen duiden de timing van invasie aan.

De vergelijking tussen de twee invaders met verschillende fysiologie leidde tot een verschil in invasiepotentieel (Figuur 18). De invader met nutriëntenpuls bevond zich na de nutriëntenpuls

in de exponentiële groeifase ten opzichte van de invader in stationaire fase. Op invasietijdstip 1 werd enkel met de stationaire invader geïnvaideerd. De invader met nutriëntenpuls werd pas bij invasietijdstip 2 toegediend. Indien invasietijdstip 2 nader bekeken werd, kon er heel duidelijk een verschil tussen de twee invaders met een verschillende fysiologie waargenomen worden. De invader met nutriëntenpuls groeide na 5 uur uit tot een abundantie van $6.9 \pm 2.5 \times 10^6$ cellen/mL, terwijl de stationaire invader na 5 uur uitgroeide tot een abundantie van $3.7 \pm 1.3 \times 10^6$ cellen/mL. Deze abundantie werd nog aangehouden tot 9 uur na de invasie bij beide invaders. 24 uur later was de abundantie van de invader met nutriëntenpuls gedaald tot $2.9 \pm 1.0 \times 10^6$ cellen/mL en de abundantie van de stationaire invader was gedaald tot $6.9 \pm 1.5 \times 10^5$ cellen/mL. 4 uur later was er opnieuw een daling bij beide invaders tot $1.6 \pm 0.8 \times 10^6$ cellen/mL en $4.1 \pm 3.4 \times 10^5$ cellen/mL respectievelijk.

Bij invasietijdstip 3 groeiden beide invaders na 4 uur na de invasie uit tot gelijke abundanties van gemiddeld $2.9 \pm 0.8 \times 10^6$ cellen/mL. 24 uur later waren beide invaders gedaald tot gemiddeld $1.1 \pm 0.4 \times 10^6$ cellen/mL, waarna het nog constant bleef voor 4 uur.

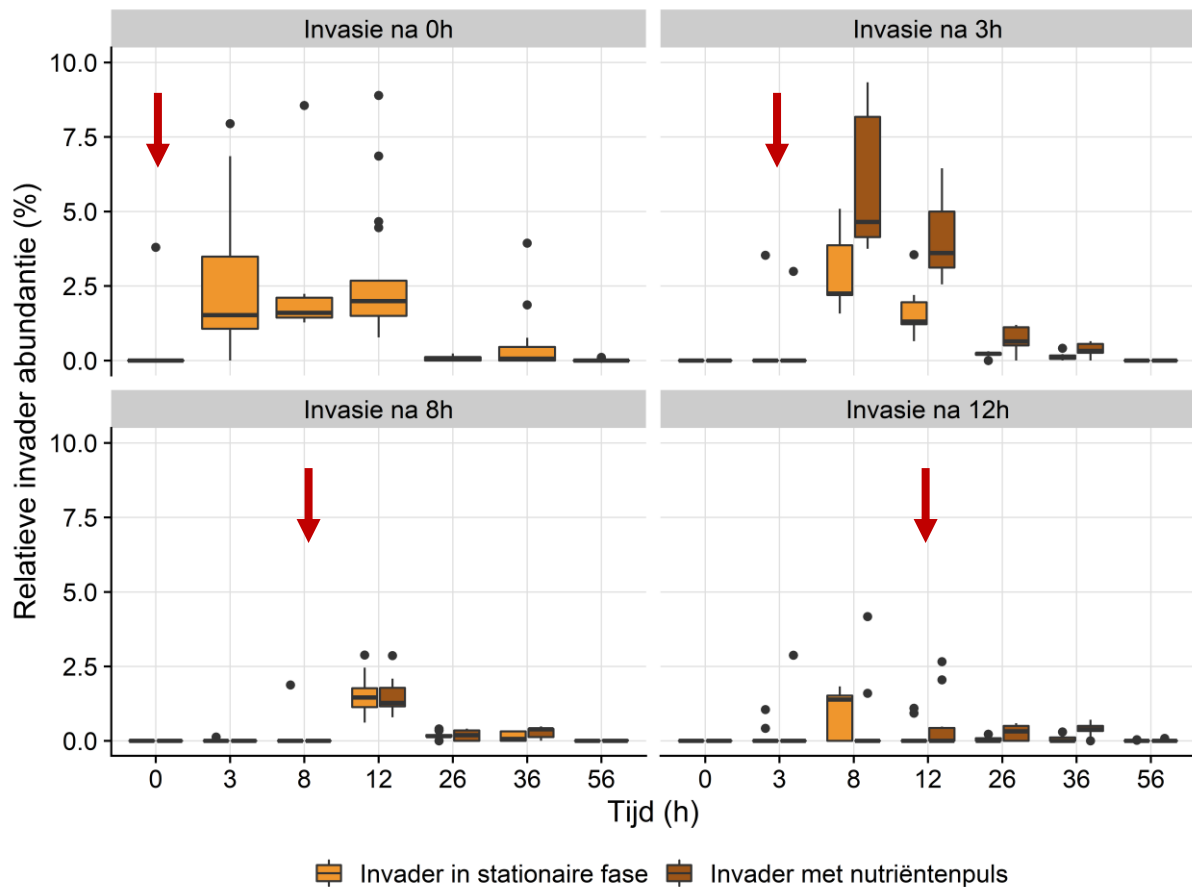
Bij invasietijdstip 4 groeiden de invaders uit tot de laagste abundanties na de invasie. Dit was voor de invader met nutriëntenpuls tot $1.8 \pm 0.5 \times 10^6$ cellen/mL en voor de stationaire invader tot $6.4 \pm 4.0 \times 10^5$ cellen/mL, 14 uur na de invasie. De abundantie van de stationaire invader zit onder de inoculatie concentratie van 1.0×10^6 cellen/mL. Enkel de invader met nutriëntenpuls vertoonde in dit invasietijdstip groei. 20 uur later daalde de abundantie voor de invader met een nutriëntenpuls met 15 % en de stationaire invader bleef constant.



Figuur 19: De totale celdensiteiten van de gemeenschappen met de twee verschillende invaders (i.e. met nutriëntenpuls en de stationaire invader) en de autochtone gemeenschap (zonder invasie) in functie van de tijd. Er waren technische ($n = 3$) en biologische ($n = 3$) replicaten per conditie. De lijnen geven de gemiddelde trend van de replicaten aan.

De totale celdensiteiten van de invader met nutriëntenpuls, de stationaire invader en de autochtone gemeenschap (zonder invasie) hadden een gelijkaardig stijgend verloop (Figuur 19). De twee gemeenschappen met de invaders bereikten een gemiddelde maximale

celdensiteit van $3.8 \pm 1.1 \times 10^8$ cellen/mL na 26 uur. De autochtone gemeenschap zonder invader bereikte een maximale celdensiteit van $3.9 \pm 2.9 \times 10^8$ cellen/mL na 36 uur.

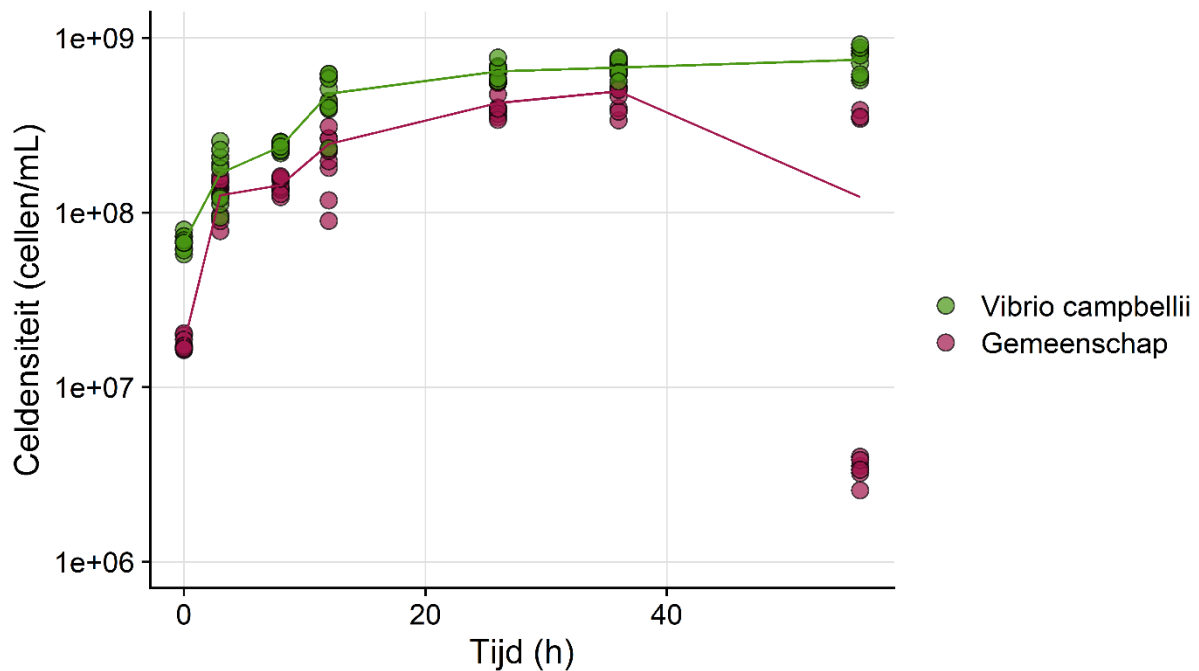


Figuur 20: Relatieve invader abundantie van de stationaire invader en de invader met nutriëntenpuls over de tijd bij vier verschillende invasietijdstpunten ($t_1 = 0h$, $t_2 = 3h$, $t_3 = 8h$, $t_4 = 12h$ na de initiële nutriëntenpuls). Er waren technische ($n = 3$) en biologische ($n = 3$) replicaten per conditie. De rode pijlen duiden de timing van invasie aan.

Wanneer de relatieve invader abundantie onderzocht werd, waren er ook steeds verschillende patronen op te merken over de verschillende invasietijdstpunten (Figuur 20). Bij invasietijdstpunt 1 bereikte de stationaire invader een relatieve abundantie van gemiddeld 3.6 ± 3.0 %, wat nog constant bleef tot 12 uur na de invasie. 26 uur na de invasie daalde de relatieve abundantie tot een minimum van 0.09 ± 0.08 %.

Bij invasietijdstpunt 2 bereikte de stationaire invader een maximale relatieve abundantie van 3.0 ± 2.3 %, 5 uur na de invasie. Terwijl de invader met nutriëntenpuls een maximale relatieve abundantie van 5.8 ± 2.2 % bereikte, 5 uur na de invasie. Hierna was er voor beide invaders een dalende trend.

Bij invasietijdstpunt 3 bereikten beide invaders een maximale relatieve abundantie van 1.5 ± 0.6 %, 4 uur na de invasie. 14 uur later daalde het tot 0.26 ± 0.11 % en bleef het constant. Bij invasietijdstpunt 4 bereikte enkel de invader met nutriëntenpuls een significante relatieve abundantie van 0.45 ± 0.12 %, 14 uur na de invasie.



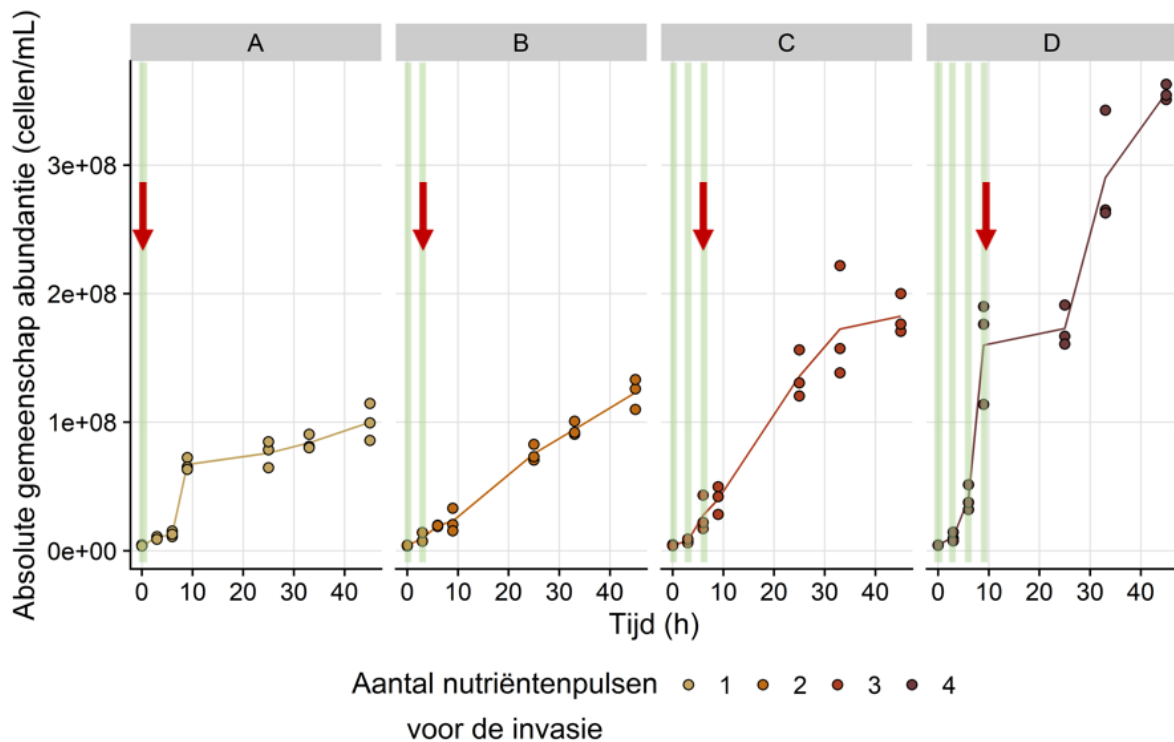
Figuur 21: De totale celdensiteiten van twee controles; *V. campbellii* en de autochtone gemeenschap. Er waren technische (n = 3) en biologische (n = 3) replicaten per conditie. De lijnen geven de gemiddelde trend van de replicaten aan.

Bij dit experiment werd ook de dynamica van een pure cultuur van *V. campbellii* en een niet-geïnvadeerde gemeenschap opgevolgd (Figuur 21). Hieruit bleek dat *V. campbellii* steeds een hogere celdensiteit bereikte dan de autochtone gemeenschap. De celdensiteit van *V. campbellii* was gemiddeld 35.0 ± 9.6 % hoger dan de gemeenschap tussen 3 uur en 36 uur. De begin celdensiteit verschilde meer tussen de twee controles. De gemeenschap startte bij een celdensiteit van $1.8 \pm 0.2 \times 10^7$ cellen/mL, terwijl *V. campbellii* bij een celdensiteit van $6.8 \pm 0.7 \times 10^7$ cellen/mL startte. De gemeenschap bereikte zijn maximale celdensiteit van $4.9 \pm 1.2 \times 10^8$ cellen/mL na 36 uur. *V. campbellii* bereikte zijn maximale celdensiteit van $7.5 \pm 1.3 \times 10^8$ cellen/mL na 56 uur.

3.3 Experiment 3: Invasie na herhaaldelijke nutriëntenpulsen

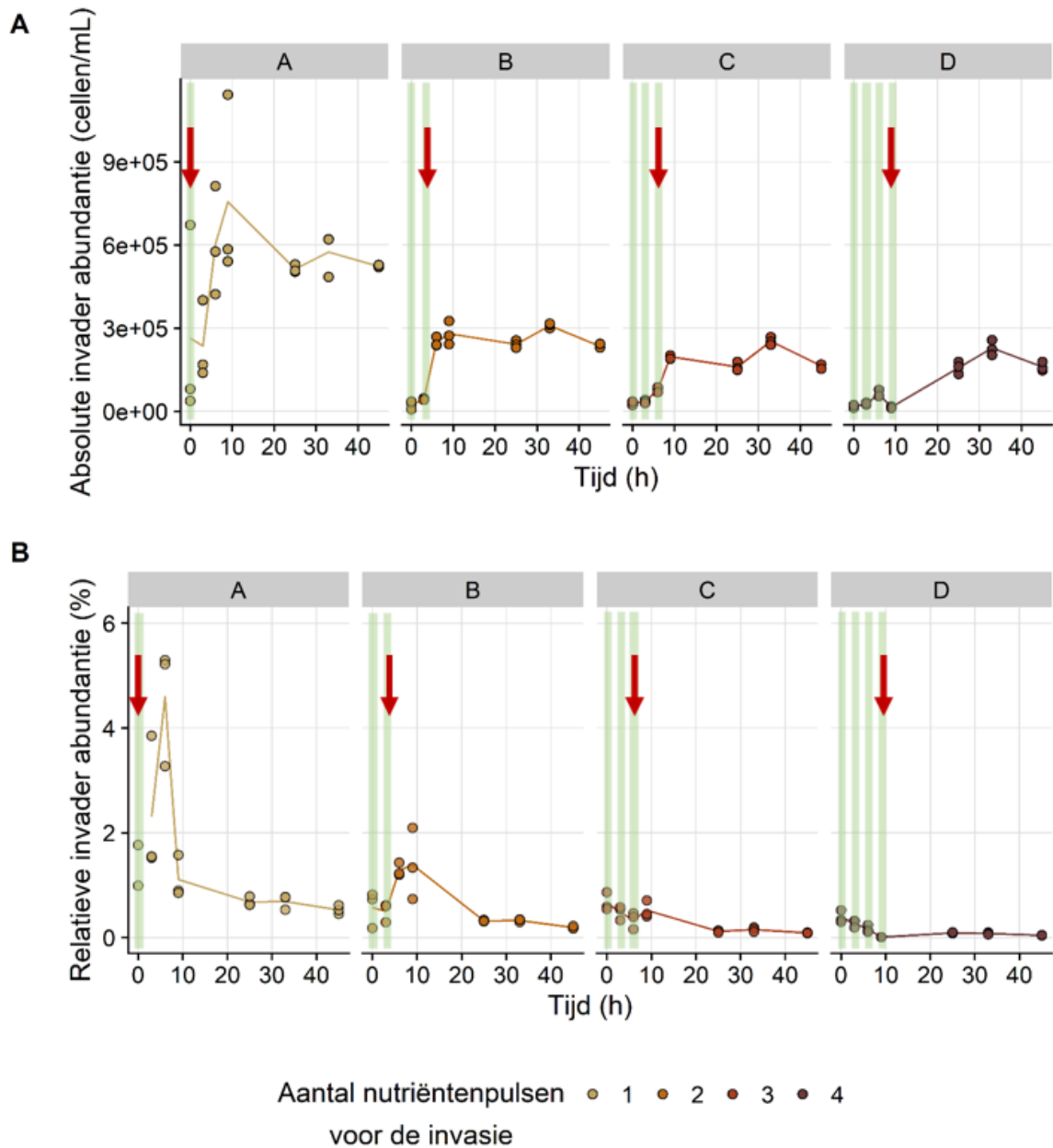
In de praktijk wordt er in de larvale stadia van garnalen om de drie uur voeding toegediend. Met dit experiment werd de invloed van het herhaaldelijk toedienen van nutriënten op het invasiepotentieel bepaald. Enerzijds werd nagegaan of een gemeenschap, die reeds meerdere nutriëntenpulsen gekregen had voor het invasie-event, meer of minder weerbaar was in vergelijking met een autochtone gemeenschap die nog geen nutriëntenpuls gekregen had voor de invasie. Anderzijds werd er nagegaan of een herhaaldelijke nutriëntenpuls ervoor kon zorgen dat de invader *V. campbellii* LMG 21363 na invasie langer in de microbiële gemeenschap bleef. De verduidelijking over de gebruikte condities wordt weergegeven in Figuur 13.

3.3.1 Invloed van herhaaldelijke nutriëntenspulsen op het invasiepotentieel



Figuur 22: De totale celdensiteiten van alle condities bij conditie A, B, C en D in functie van de tijd. Conditie A, B, C en D werden met elkaar vergeleken om na te gaan of de gemeenschap meer of minder invasieresistent is na het verkrijgen van herhaaldelijke nutriëntenspulsen voor de invasie. Conditie A: invasie op 0h en nutriëntenspuls op 0h; Conditie B: invasie op 3h en nutriëntenspuls op 0h en 3h; Conditie C: invasie op 6h en nutriëntenspuls op 0h, 3h en 6h; Conditie D: invasie op 9h en nutriëntenspuls op 0h, 3h, 6h en 9h. Er waren biologische replicaten per conditie ($n = 3$). De rode pijlen duiden de timing van invasie aan en de groene balken tonen de timing van de nutriëntenspuls aan. De lijnen geven de gemiddelde trend van de replicaten aan.

De algemene trend van de absolute gemeenschap abundanties was bij elke conditie stijgend over het verloop van 45 uur (Figuur 22). Conditie A groeide uit tot een maximale abundantie van $1.0 \pm 0.1 \times 10^8$ cellen/mL, conditie B tot $1.2 \pm 0.1 \times 10^8$ cellen/mL, conditie C tot $1.8 \pm 0.2 \times 10^8$ cellen/mL en conditie D groeide uit tot een maximale abundantie van $3.6 \pm 0.06 \times 10^8$ cellen/mL na 45 uur. Het is duidelijk dat er een verband is tussen het aantal toegediende nutriëntenspulsen en de maximale abundantie van de condities en hoe snel deze bereikt worden. Hoe meer nutriëntenspulsen toegediend werden, hoe hoger de abundantie van de gemeenschap uitgroeide.



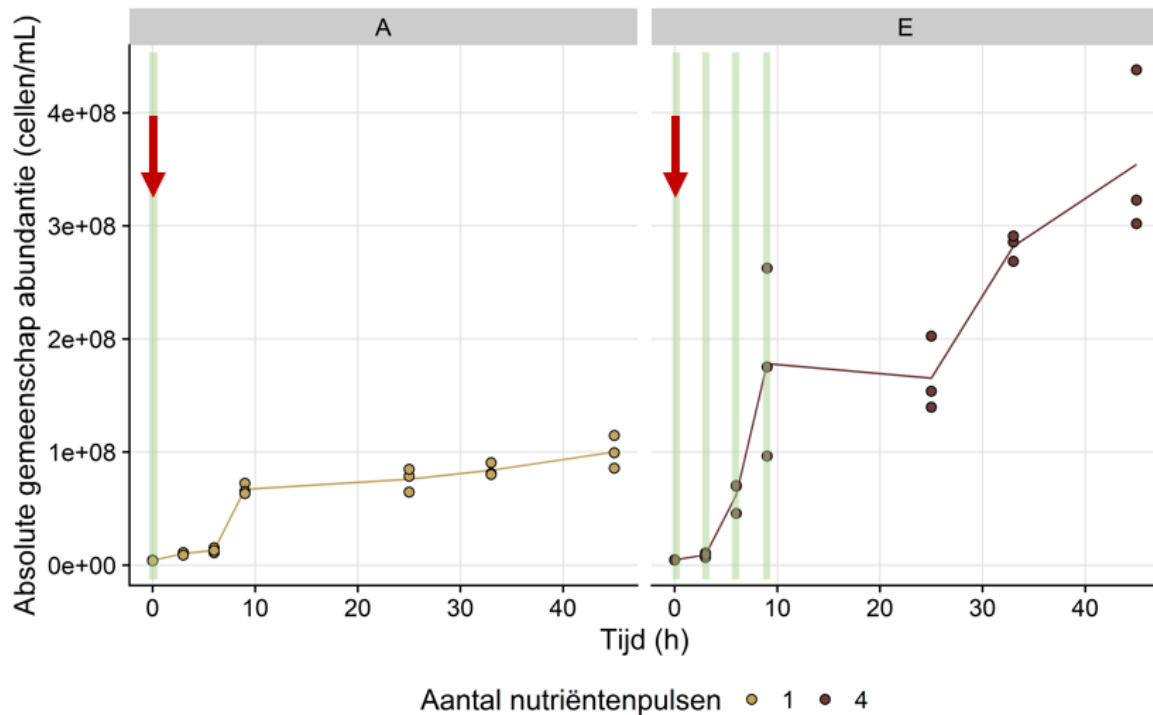
Figuur 23: (A) De absolute invader abundantie bij conditie A, B, C en D in functie van de tijd. (B) De relatieve invader abundantie bij conditie A, B, C en D in functie van de tijd. Condities A, B, C en D werden met elkaar vergeleken om na te gaan of de gemeenschap meer of minder invasieresistent was na het verkrijgen van herhaaldelijke nutriëntenpulsen voor de invasie. Conditie A: invasie op 0h en nutriëntenpuls op 0h; Conditie B: invasie op 3h en nutriëntenpulsen op 0h en 3h; Conditie C: invasie op 6h en nutriëntenpulsen op 0h, 3h en 6h; Conditie D: invasie op 9h en nutriëntenpulsen op 0h, 3h, 6h en 9h. Er waren biologische replicaten per conditie ($n = 3$). De rode pijlen duiden de timing van invasie aan en de groene balken tonen timing van de nutriëntenpulsen aan. De lijnen geven de gemiddelde trend van de replicaten aan.

De totale invader abundantie en de snelheid waarmee de verschillende condities dit bereikten, verschilden nadrukkelijk met elkaar (Figuur 23A). Bij conditie A, waar de invasie- en nutriënttoediening op hetzelfde tijdstip plaatsvond, groeide de invader abundantie na 6 uur tot zijn maximum van $7.6 \pm 3.4 \times 10^5$ cellen/mL. Deze abundantie daalde lichtjes tot $5.1 \pm 0.1 \times 10^5$ cellen/mL na 25 uur na de invasie en bleef constant tot 45 uur na de invasie. Bij conditie

B groeide de invader abundantie na 3 uur na de invasie uit tot $2.5 \pm 0.2 \times 10^5$ cellen/mL, waarna het constant bleef tot 42 uur na de invasie. Conditie C vertoonde een gelijkaardig verloop als conditie B. Na 3 uur na de invasie groeide de invader abundantie uit tot $1.9 \pm 0.07 \times 10^5$ cellen/mL, waarna het 39 uur na de invasie constant bleef. Conditie D vertoonde de traagste groei in abundantie na de invasie. Pas 23 uur na de invasie werd zijn maximale abundantie van $2.3 \pm 0.3 \times 10^5$ cellen/mL bereikt.

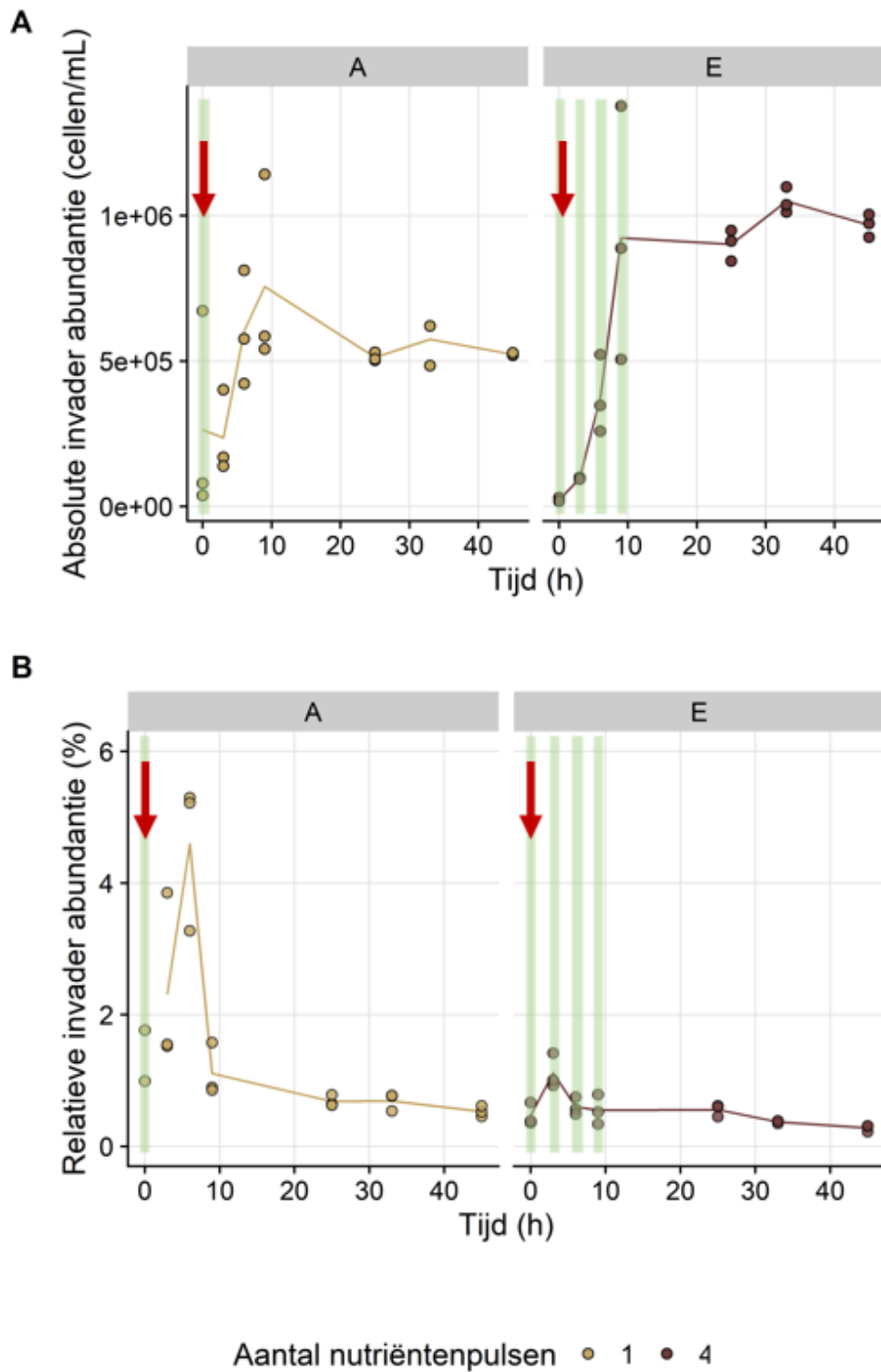
De relatieve invader abundanties van condities A en B vertoonden een gelijkaardig verloop (Figuur 23B). Conditie A groeide na 6 uur na de invasie uit tot een relatieve invader abundantie van $4.6 \pm 1.2 \%$, waarna het 3 uur later sterk daalde tot $1.1 \pm 0.4 \%$. Hierna bleef een dalende trend zich aanhouden tot een minimum van $0.5 \pm 0.08 \%$ na 45 uur. Conditie B groeide na 3 uur na de invasie uit tot een relatieve invader abundantie van $1.3 \pm 0.1 \%$, waarna het later ook sterk daalde tot $0.14 \pm 0.07 \%$. Conditie C en D vertoonden zeer lage relatieve invader abundanties na de invasie. De maximale relatieve invader abundantie voor conditie C was $0.15 \pm 0.04 \%$, wat na 33 uur werd bereikt. Conditie D bereikte een maximale relatieve invader abundantie van $0.09 \pm 0.01 \%$ na 25 uur.

3.3.2 Invloed van herhaaldelijke nutriëntenpulsen op de verblijftijd van de invader *V. campbellii* in de microbiële gemeenschap



Figuur 24: De totale celdensiteiten bij conditie A en E in functie van de tijd. Conditie A en E werden met elkaar vergeleken om na te gaan of herhaaldelijke nutriëntenpulsen na invasie de aanwezigheid van *V. campbellii* in de autochtone gemeenschap kon verlengen. Conditie A: Invasie op 0h en nutriëntenpuls op 0h; Conditie E: invasie op 0h en nutriëntenpulsen op 0h, 3h, 6h en 9h. Er waren biologische replicaten per conditie ($n = 3$). De rode pijlen duiden de timing van invasie aan en de groene balken tonen de timing van de nutriëntenpulsen aan. De lijnen geven de gemiddelde trend van de replicaten aan.

De absolute abundanties van de gemeenschappen groeiden sneller en hoger uit bij conditie E dan bij conditie A (Figuur 24). Conditie E bereikte een maximale celdensiteit van $3.5 \pm 0.7 \times 10^8$ cellen/mL na 45 uur, terwijl conditie A slechts een maximale abundantie bereikte van $1.0 \pm 0.1 \times 10^8$ cellen/mL na 45 uur.



Figuur 25: (A) De absolute invader abundantie bij conditie A en E in functie van de tijd. (B) De relatieve invader abundantie bij conditie A en E in functie van de tijd. Conditie A en E werden met elkaar vergeleken om na te gaan of herhaaldelijke nutriëntenpulsen na invasie de aanwezigheid van *V. campbellii* in de autochtone gemeenschap kon verlengen. Conditie A: invasie op 0h en nutriëntenpuls op 0h; Conditie E: invasie op 0h en nutriëntenpulsen op 0h, 3h, 6h en 9h. Er waren biologische replicaten per conditie ($n = 3$). De rode pijlen duiden de timing van invasie aan en de groene balken tonen de timing van de nutriëntenpulsen aan. De lijnen geven de gemiddelde trend van de replicaten aan.

De totale invader abundanties verschilden duidelijk tussen conditie A en E (Figuur 25A). Conditie E bereikte een maximale invader abundantie van $1.1 \pm 0.04 \times 10^6$ cellen/mL na 33 uur, terwijl conditie A een maximale invader abundantie bereikte van $7.6 \pm 3.4 \times 10^5$ cellen/mL na 9 uur. Na het bereiken van de maximale abundantie bij conditie A, was er na 14 uur een daling tot $5.1 \pm 1.4 \times 10^5$ cellen/mL, waarna het constant bleef tot 45 uur na de invasie. Na 9 uur bij conditie E werd het maximum al bijna bereikt en had het een licht stijgend verloop tot zijn maximum.

Het verloop van de relatieve invader abundantie was bij beide condities gelijkaardig (Figuur 25B). Na de invasie steeg bij beide condities de relatieve abundantie tot een piek van $4.6 \pm 1.2 \%$ na 6 uur bij conditie A en tot $1.1 \pm 0.3 \%$ bij conditie E na 3 uur. 3 uur later daalde bij beide condities de relatieve abundantie sterk, waarna het een blijvend dalend verloop vertoonde.

4 Algemene discussie

4.1 Invasie studies met fluorescente proteïnen

4.1.1 Bespreking van de resultaten

Het modelsysteem voor invasie werd gevalideerd om een inzicht te krijgen of de GFP-expressie van de invaderende pathogeen, *V. campbellii* LMG 21363, stabiel en betrouwbaar was. Hierbij werden drie testen uitgevoerd, waarbij de GFP-expressie getest werd in functie van de tijd, de groeifasen en in relatie met een gemengde gemeenschap.

In functie van de tijd daalde de GFP-expressie bij de conditie zonder kanamycine, terwijl bij de conditie met kanamycine, zoals verwacht, de GFP-expressie hoog bleef (Figuur 14). Een tweede observatie bij dit experiment was dat indien de verschillende nutriëntencondities met elkaar vergeleken werden in afwezigheid van kanamycine, de GFP-expressie een veel snellere daling had in het rijkere medium (1 x MB) ten opzichte van de twee armere media (0.01 x MB en 0.1 x MB). De vooropgestelde hypothese was dat *V. campbellii* zijn GFP-productie zou verminderen onder stresscondities, in dit geval een nutriëntentekort. Maar in tegenstelling tot de hypothese daalde de GFP-expressie van *V. campbellii* het snelst in het rijkste medium. Onder alle nutriëntenconcentraties vertoonde *V. campbellii* LMG 21363 steeds een hoge GFP-expressie ($\pm 100\%$) tijdens de exponentiële groei (Figuur 15). Na het bereiken van de stationaire fase (na 11.5 uur) vertoonde het rijkste medium (1 x MB) een daling in GFP-expressie, terwijl het bij de andere media steeds hoog bleef. Dit was een bevestiging van de vorige resultaten waarbij er ook een snellere afname waargenomen werd bij het rijkste medium. Wanneer de invader interageert met een gemengde microbiële gemeenschap werd verwacht dat de invader zijn algemene genexpressie ging aanpassen, wat mogelijk kan resulteren in een daling van de GFP-expressie. De drie geteste gemeenschappen vertoonden eenzelfde patroon waarbij er een daling was van de GFP-expressie over de drie dagen naar gemiddeld $87.4 \pm 6.8\%$ in vergelijking met $96.5 \pm 4.8\%$ in de afwezigheid van de gemengde gemeenschap (Figuur 16). Hieruit blijkt dat wanneer de invader interageert en in competitie gaat met de gemengde microbiële gemeenschap hij zijn genexpressie aanpast en bijgevolg de GFP-expressie zal dalen.

Uit deze resultaten is gebleken dat de GFP-expressie van de model-invader niet stabiel is. Het verlies van de GFP-expressie en de timing ervan is afhankelijk van de hoeveelheid nutriënten die aanwezig zijn in het medium. Ook is het afhankelijk van de timing over de groeicurve, waar er bij de laat stationaire fase verlies van GFP-expressie op te merken was. Ook is het afhankelijk van de aanwezigheid van een autochtone microbiële gemeenschap. Op basis van deze resultaten werd besloten om voor de volgende invasie-experimenten steeds met lage nutriëntenconcentraties te werken en de experimenten niet langer te laten duren dan drie dagen. Het verlies van de GFP-expressie kan te verklaren zijn door een korte halfwaardetijd van het GFP-eiwit. Een hieropvolgend experiment dat dit bepaalt, zou hier meer duidelijkheid over moeten geven. Hiernaast kunnen ook twee mogelijke verklaringen (i.e. een afwijkend

groeipatroon of celdood) weerlegd worden aan de hand van de resultaten (Extra figuur 1, Extra figuur 3, Extra figuur 4 en Extra figuur 5). Een andere mogelijkheid is dat de GFP-variant die gebruikt wordt in dit onderzoek geen stabiele variant is. In bijvoorbeeld de studie van Tombolini et al. (2006) werden ook inconsistenties in de GFP-expressie en -stabiliteit gerapporteerd. Hierbij werd aangetoond dat binnen één kolonie, afkomstig van een enkele cel, verschillende delen fluorescent waren en andere delen niet. Een definitief besluit voor het verlies van GFP-expressie kan nog niet genomen worden zonder verder onderzoek.

Veel invasiestudies hebben experimentele setups die gebruik maken van fluorescente proteïnen voor de opvolging van de invaders (De Roy et al., 2013; Yang et al., 2017), maar zelden worden hierop controles toegepast en de eventuele limitaties van de experimenten vermeld. De opvolging van het eventuele verlies van de GFP-expressie is noodzakelijk om de resultaten van invasiestudies correct te kunnen interpreteren. Een variërende GFP-expressie tijdens een experiment kan tot andere resultaten en dus ook verkeerde conclusies leiden. Twee voorbeelden in de literatuur waarbij controle op de GFP-expressie werd vermeld, is bij studies van Arana et al. (2003) en Chu & Lu (2008). Maar er wordt vaker niet dan wel gecontroleerd voor het eventueel verlies op GFP-expressie. Tevens zijn dit ook meer controles naast het experiment in plaats van controles in preliminaire experimenten.

4.1.2 Alternatieven voor invasie op te volgen

Het *gfp* gen dat afkomstig is van de kwal *Aequorea Victoria* codeert voor het groen fluorescente proteïne. Het is al door vele auteurs gerapporteerd dat het veel mogelijkheden heeft om het te gebruiken als biomarker voor het opvolgen of visualiseren van bacteriën in ecologische studies op een non-destructieve manier (Arana et al., 2003; Chu et al., 2008; Errampalli et al., 1999; Lowder et al., 2000). De fluorescentie van het *gfp* gen vereist geen substraten, met uitzondering van zuurstof, is niet soort specifiek en is goedkoop. Het enige wat het *gfp* gen vereist, is genexpressie van de gastheercel (Lowder et al., 2000). Alternatieven voor de opvolging van invasie, naast *gfp* gecombineerd met flow cytometrie, zijn bijvoorbeeld selectieve uitplating, qPCR en fluorescentie microscopie (Van Nevel et al., 2017).

Indien selectieve uitplating wordt gekozen als alternatieve methode zou een medium moeten gekozen worden zodanig dat de invader op dergelijk medium kan groeien maar de microbiële gemeenschap niet. Hierbij zou gebruik gemaakt kunnen worden van een selectief antibiotica medium, bijvoorbeeld kanamycine of rifampicine aangezien *V. campbellii* LMG 21363 deze resistentie bevat. Hier moet wel rekening gehouden worden met het feit dat de kans bestaat dat bacteriën uit een microbiële gemeenschap antibioticaresistentie bezitten, door het overmatig gebruik ervan in de aquacultuur. Een ander selectief medium om *Vibrio* spp. te isoleren is het TCBS (Thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose) agar medium (Di Pinto et al., 2011). Hierbij moet men wel zeker zijn dat er geen andere *Vibrio*'s aanwezig zijn in de autochtone gemeenschap. Hiernaast is ook de validiteit van het TCBS-agar voor de isolatie van *Vibrio*'s niet waterdicht. TCBS agar is remmend voor veel *Vibrio* soorten die voorkomen in

het mariene milieu (Simidu & Tsukamoto, 1980). Tevens is het geen differentieel medium omdat *Vibrio* soorten zoals *V. harveyi*, die variabel zijn in het gebruik van sucrose, niet kunnen worden onderscheiden van andere sucrose-positieve of sucrose-negatieve soorten (Harris et al., 1996; Simidu et al., 1980).

Een andere moeilijkheid dat selectieve uitplating met zicht meebrengt, is dat *Vibrio*'s gekend zijn om een VBNC (Viable but not culturable) staat te bereiken. In deze staat zijn de bacteriën levend en metabolisch actief, maar kunnen ze niet uitgroeien tot zichtbare kolonies op agar medium (Ayrapetyan & Oliver, 2016). De bacteriën kunnen wel nog steeds gevaarlijk zijn en ziektes veroorzaken in deze slapende staat (Du et al., 2007). Deze VBNC staat is een zelfbeschermingsmechanisme van micro-organismen als een reactie op omgevingsstress, zoals nutriëntentekort of een overlevingsstrategie wanneer ze in een nieuwe omgeving worden geïntroduceerd (Ramamurthy et al., 2014). De bacterie blijft in deze staat totdat de omgevingsomstandigheden terug gunstig worden voor groei en celdeling (Ayrapetyan et al., 2016; Colwell, 2000). In een studie van Lowder et al. (2000) werd aangetoond dat VBNC cellen nog steeds GFP-expressie vertoonden over een periode van 6 maanden.

Andere nadelen van selectieve uitplating zijn de hoge arbeids- en tijdintensiteit. Ook wordt maar een minieme fractie van het aantal bacteriën gekwantificeerd (< 1 % van alle bacteriën) ten opzichte van flow cytometrie wat kwantificatie van de totale bacteriële gemeenschap kan uitvoeren (Van Nevel et al., 2017).

Een alternatief voor de conventioneel cultuur-gebaseerde methoden dat ook de VBNC pathogene *Vibrio*'s kan detecteren, is de moleculaire detectie methode qPCR (quantitative real-time PCR) (Ramamurthy et al., 2014). Het wordt gebruikt als een indirecte methode om de absolute bacteriële abundantie te meten door de abundantie van de 16S rRNA gen kopieën te meten in het geëxtraheerd DNA (Lopez-Roldan et al., 2013). Naast het 16S rRNA gen kunnen ook specifieke primers gekozen worden, zoals bijvoorbeeld bij een GFP-gelabelde bacterie, kan het *gfp* gen als target gebruikt worden om de bacteriestam te kwantificeren (Verthé et al., 2004). Om onderscheiding te maken tussen het DNA van levende en dode bacteriën worden intercalerende nucleïne-zuren kleurstoffen, zoals ethidium monoazide (EMA) en propidium monoazide (PMA) gebruikt (Lv et al., 2016).

De familie *Vibrionaceae* bestaat uit 159 soorten in 6 genera, waarvan het geslacht *Vibrio* het grootste en meest uitgebreid gekarakteriseerde is (Nishiguchi & Nair, 2003). Het gebruik van het 16S rRNA gen gebied voldoet niet om de verschillende *Vibrio* soorten van elkaar te onderscheiden vanwege de hoge overeenkomst van de 16S rRNA sequenties tussen de soorten (Sawabe et al., 2007). In het geval van invasiestudies in aquacultuurgemeenschappen, is het strikt noodzakelijk om over specifieke primers te beschikken, omdat de kans dat de autochtone gemeenschap ook *Vibrio*'s bevat reëel is (Alfiansah et al., 2018; Kokashvili et al., 2015; Möller et al., 2020). Er zijn reeds meerdere studies geweest die gen-sequenties proberen te identificeren dewelke een hogere resolutie

voor de identificatie en taxonomie van *Vibrionaceae* zouden moeten hebben (Gabriel et al., 2014; Machado & Gram, 2015; Sawabe et al., 2007; Thompson et al., 2005; Thompson et al., 2001). Maar, tot op heden is er nog geen enkel gen geïdentificeerd dat alle *Vibrio* soorten van elkaar kan onderscheiden.

4.2 Invasie-experimenten na nutriëntenpulsen

4.2.1 Invloed van de timing van invasie

Het toedienen van voeding is een essentiële operationele praktijk in de aquacultuur. Er werd reeds aangetoond dat de beschikbaarheid van nutriënten één van de belangrijkste kenmerken is die de invasie van de gemeenschap bepaalt (Li & Stevens, 2012; Yang et al., 2017). Het invasiepotentieel van de invader *V. campbellii* in een microbiële gemeenschap werd gekwantificeerd na het toedienen van een nutriëntenpuls. Ook werd de invloed van de invader fysiologie nagegaan door naast een invasie met een stationaire invader, ook een invasie uit te voeren met een invader die actief groeide.

De timing van invasie na een nutriëntenpuls had een grote invloed op het invasiepotentieel (Figuur 17). Voor elk van de verschillende invasietijdstippen is er steeds een ander patroon van de invader op te merken. Wanneer de invasie op hetzelfde tijdstip plaatsvindt als de nutriëntenpuls, is de maximale invader abundantie die bereikt wordt het hoogst en de verblijftijd van de invader (i.e. de periode waarbij de invader een hogere abundantie heeft dan de initiële invader abundantie) in de gemeenschap het langst. Indien de invasie op een later tijdstip na de nutriëntenpuls plaatsvindt, groeit de invader uit tot lagere maximale abundanties en verkort de verblijftijd van de invader. Dit kan verklaard worden doordat de beschikbaarheid van de nutriënten daalt naarmate de autochtone gemeenschap over de tijd de nutriënten gaat verbruiken. De hoeveelheid beschikbare nutriënten is op invasietijdstip 1 het hoogst. De invader en de gemeenschap moeten concurreren voor de beschikbare nutriënten. De invader *V. campbellii* kan de aanwezige nutriënten snel verbruiken en stijgt hierdoor snel in abundantie. Dit gedrag van de opportunistische invader *V. campbellii* is typisch voor een r-strateeg. De r-strategen kunnen nutriënten zeer snel exploiteren en snel in populatiegrootte stijgen indien de omstandigheden gunstig zijn (i.e. hoge nutriëntenbeschikbaarheid per cel, weinig concurrentie en frequente verstoringen in de omgeving) (De Schryver & Vadstein, 2014). Omgekeerd zal een meer stabiele omgeving met minder voedingsstoffen per cel een omgeving creëren voor langzaam groeiende bacteriën, de K-strategen genoemd (Defoirdt, 2016). Veel auteurs hebben het belang van nutriënttoediening op de invloed van invasie beschreven (Acosta et al., 2015; Defoirdt, 2016; Eisenhauer et al., 2013; Li et al., 2012; Stocker, 2012). Het toevoegen van nutriënten aan een systeem verhoogt de microbiële draagkracht, waardoor er een niche/opening vrijkomt voor de pathogene invaders om in te groeien, waardoor de kans op invasie, infecties en ziektes verhoogt (De Schryver & Vadstein, 2014). De stijging van de invader abundantie door het verhogen van het aantal nutriënten is in lijn met meerdere studies (Davis et al., 2000; Kuebbing et al., 2013; Mallon et al., 2015). Mallon et al. (2015) toonde aan dat het verhogen van de nutriëntenbeschikbaarheid invasie kan bevoordelen door een

gerelaxeerde nutriëntencompetitie. Door de invader toe te voegen samen met een hoge nutriëntenbeschikbaarheid wordt de competitie tussen gemeenschap en invader verlaagd, waardoor de invader een opening krijgt om zich te vestigen. Dit wordt ook bevestigd door de fluctuerende nutriëntenhypothese, die stelt dat het invasiepotentieel toeneemt of afneemt naarmate de beschikbaarheid van de nutriënten toeneemt of afneemt (Davis et al., 2000). Ook de complexiteit en diversiteit van de nutriënten kunnen een rol spelen. Door de aanwezigheid van veel verschillende nutriënten, zijn er meerdere open niches en dus meerdere invasiemogelijkheden.

Het invasiepotentieel van *V. campbellii* is bij de latere invasietijdspunten lager qua maximale invader abundantie en heeft een kortere verblijftijd in de gemeenschap. Dit is te verklaren doordat de nutriëntenbeschikbaarheid op deze latere tijdspunten is gedaald ten opzichte van het eerste invasietijdspunt. De gemeenschap kon reeds de nutriënten gaan verbruiken waardoor er minder aanwezig waren voor de invader. Een interessante controle die uitgevoerd kon worden bij dit experiment was de kwantificatie van het aantal nutriënten dat verbruikt werd bij elke tijdspunt. Het verloop van de effectieve nutriëntenconcentratie over het invasie-experiment zou de hypothese kunnen versterken. Hiernaast kan de aanpassingstijd (i.e. lag fase) van de invader aan de nieuwe omgeving en de aanwezige nutriënten ook een invloed hebben. Wanneer de invader in de gemeenschap terechtkomt, zal deze zich aanpassen aan het nutriëntenrijk milieu. Tijdens deze aanpassingstijd is de invader reeds aanwezig in de gemeenschap, maar tijdelijk minder fit. Bij de latere invasietijdspunten zijn reeds meer nutriënten verbruikt. Bij invasietijdspunten 2 en 3 kan de invader nog uitgroeien in de gemeenschap, hoewel de abundantie en verblijftijd lager liggen dan bij invasietijdspunt 1. Bij invasietijdspunt 4 groeit de invader abundantie niet hoger dan de initiële inoculatie abundantie. Deze bevinding wordt ook bevestigd door studies van Li et al. (2012) en Yang et al. (2017) waarbij de autochtone gemeenschap reeds nutriënten kon verbruiken, waardoor de gedestabiliseerde omgeving terug deels wordt gestabiliseerd, wat de r-strategen een minder groot voordeel geeft. De timing van invasie heeft dus een grote impact op het invasiepotentieel van de autochtone gemeenschap. Deze stelling komt overeen met de bevindingen uit de studies van Jones et al. (2017) en Li et al. (2012) waarbij het invasiesucces daalde in functie van de tijd, door de groei en het verbruik van nutriënten van de autochtone gemeenschap.

De invader *V. campbellii* is tevens ook zeer goed in het verbruiken van de nutriënten in het LB-medium (Figuur 21) en zelfs beter dan de autochtone gemeenschap. Maar wanneer er competitie heerst tussen de gemeenschap en de invader, is duidelijk op te merken dat de invader het moeilijk heeft om uit te groeien, aangezien hij slechts uitgroeit tot enkele percentages ten opzichte van de gemeenschap (Figuur 20). In een studie van Van Nevel et al. (2013) werd een gelijkaardige observatie bekomen. Hierbij overleefde de model-invader *Pseudomonas putida* twaalf dagen in drinkwater, na toevoeging van koolstof, stikstof en fosfor. In oppervlaktewater met gelijkaardige nutriëntenconcentraties overleefde *P. putida* niet, wat het belang van de competitie van de autochtone microbiële gemeenschap aantoont. Het antagonistisch effect van de autochtone microbiële gemeenschap op de overleving en groei

van de invader is door vele auteurs reeds beschreven (Eisenhauer et al., 2013; Fargione et al., 2005; Kennedy et al., 2002; Mallon et al., 2015; Naeem et al., 2000; Van Nevel et al., 2013). De hypothese hiervoor zou zijn dat de autochtone gemeenschap enerzijds inhiberende componenten zou produceren in het water (Van Nevel et al., 2013). Anderzijds is het de niche-bezetting van koolstofbronnen of andere nutriëntenbronnen door de autochtone gemeenschap (De Roy et al., 2013).

4.2.2 Invloed van de invader fysiologie

De invloed van de invader fysiologie werd onderzocht door een invader, die op hetzelfde moment een nutriëntenpuls verkreeg als de gemeenschap, te vergelijken met een andere invader die in stationaire fase was. Hieruit kon geconcludeerd worden dat de initiële invader fysiologie een grote invloed heeft op het invasiepotentieel van *V. campbellii*. De twee verschillende invaders vertonen een groot verschil in absolute en relatieve invader abundantie en dit voornamelijk bij invasietijdstip 2 (Figuur 18 en Figuur 20). De invader met nutriëntenpuls groeit uit tot hogere abundanties en heeft ook een langere verblijftijd in de gemeenschap dan de stationaire invader. Dit is te verklaren doordat de invader met nutriëntenpuls zich reeds kon aanpassen aan de nutriënten en meer belangrijk reeds de nutriënten kon verbruiken, waardoor de lag fase verkort werd en de invader sneller kon uitgroeien tot hogere abundanties. Het inhiberende effect van de gemeenschap wordt zo deels omzeild. Het gedrag van de invader met nutriëntenpuls is opnieuw het typische gedrag voor een r-strategie, waarbij de invader zeer snel in populatiegrootte stijgt. Dit wordt aangetoond in de resultaten van de absolute en relatieve invader abundanties (Figuur 18 en Figuur 20). De relatieve invader abundantie is net na invasie het hoogst, terwijl bij de absolute abundanties de celdensiteiten meestal op zowel het eerste als tweede tijdstip na de invasie gelijkaardig zijn. Dit toont aan dat *V. campbellii* in het begin zeer snel groeit tot hogere abundanties in vergelijking met het gemiddeld gemeenschapslid, maar dat verder in de tijd de gemeenschap sterker uitgroeit.

Ook voor de invader met nutriëntenpuls is de timing van de invasie van groot belang. Hoe langer de gemeenschap de nutriënten kan verbruiken zonder de aanwezigheid van de invader, hoe meer resistent de gemeenschap is tegen invasie. Dit heeft dezelfde verklaring als hierboven; bij invasietijdstip 2 zijn nog niet alle nutriënten verbruikt waardoor er een open niche aanwezig is voor de invader. Bij de latere invasietijdstippen daalt de mogelijkheid voor de invader om te groeien in de gemeenschap.

Vibrio's kunnen een speciale fysiologische staat bereiken, namelijk de VBNC staat, als reactie op omgevingsstress of als overlevingsstrategie. In deze staat zijn ze wel nog metabolisch actief, maar niet kweekbaar op agar medium. Indien de omgevingsomstandigheden terug voordelig worden voor de bacterie kan het terugkeren naar een kweekbare staat. Sommige bacteriesoorten verliezen hun virulentie wanneer ze de VBNC staat bereiken of terugkeren naar kweekbare staat (Baffone et al., 2003; Cappelier et al., 2005; Lindbäck et al., 2010), terwijl

andere dit behouden of terug kunnen herstellen wanneer ze terugkeren naar een kweekbare staat (Cappelier et al., 2005; Du et al., 2007; L. Li et al., 2014; Oliver, 1995). Tevens kunnen niet alle VBNC cellen herstellen naar een kweekbare staat (Rowan, 2004). Het invasiepotentieel zal dus waarschijnlijk verschillen wanneer een bacterie in VBNC staat een microbiële gemeenschap binnenkomt in vergelijking met wanneer hij in kweekbare staat binnenkomt.

Uit de resultaten blijkt dat de fysiologie van de invader zeer belangrijk is voor het invasiepotentieel en in rekening moet gebracht worden in de aquacultuur. In aquacultuursystemen worden de gecultiveerde organismen gevoed met levende en/of droge voeding of een combinatie van beiden. Levende voeding kan bestaan uit bijvoorbeeld *Artemia*, rotiferen en meerdere soorten microalgen (Wikfors, 2004). In studies van Akbary et al. (2010), Crooks (2013) en Mahmoudzadeh et al. (2009) werd aangetoond dat het type voeding (i.e. levende, droge of gemengde voeding) een invloed heeft op de groei en overleving van gecultiveerde aquacultuurorganismen. Indien dit in acht wordt genomen, kan aan de hand van de resultaten van het experiment een hypothese opgesteld worden. Er kan gehypothetiseerd worden dat de fysiologie van de *Vibrio* zal verschillen wanneer hij via droge voeding of levende voeding binnenkomt in de gemeenschap. Hieropvolgend zal het ook een invloed hebben op het invasiepotentieel van de invader en de kans op uitbraak van infecties en ziektes. Aangezien veel ecosystemen wereldwijd gebruik maken van een hoge nutriëntentoevoer zijn deze ecosystemen potentieel kwetsbaarder en vatbaarder voor invasie (Li et al., 2012).

4.2.3 Invloed van herhaaldelijke nutriëntenpulsen op het invasiepotentieel

In aquacultuurbedrijven worden gecultiveerde organismen meerdere malen per dag gevoed. Om de invloed van dergelijke herhaaldelijke nutriëntenpulsen te kwantificeren werd nagegaan of een gemeenschap die reeds meerdere nutriëntenpulsen gekregen heeft voor het invasie-event, meer of minder weerbaar is in vergelijking met een autochtone gemeenschap die nog geen nutriëntenpuls gekregen heeft voor de invasie.

Het aantal nutriëntenpulsen voor invasie heeft duidelijk een invloed op de absolute gemeenschap abundantie, de absolute invader abundantie en de relatieve invader abundantie (Figuur 22 en Figuur 23). Hoe meer nutriëntenpulsen er toegediend werden, hoe hoger de abundantie van de gemeenschap was. Bij de absolute invader abundantie heeft het aantal nutriëntenpulsen een negatieve invloed op het invasiepotentieel van *V. campbellii*. Hoe meer nutriëntenpulsen er toegevoegd worden voor invasie, hoe lager de maximale invader abundantie. De groeisnelheid waarmee de invader zijn abundantie bereikt, daalt in correlatie met het aantal nutriëntenpulsen voor invasie (Extra figuur 12). De relatieve invader abundantie bij het laatste tijdstip bij conditie A heeft nog steeds een hogere invader abundantie dan bij de andere condities. Dit toont aan dat het aantal nutriëntenpulsen voor invasie niet alleen invloed heeft op de maximale invader abundantie, maar ook op het uiteindelijke aandeel dat de invader in de autochtone gemeenschap zal hebben. Een verklaring waarom meerdere

nutriëntenpulsen een negatieve invloed hebben op het invasiepotentieel is doordat de autochtone gemeenschap zich volop kan voeden met de aanwezige nutriënten. Hoe meer nutriënten er worden toegevoegd, hoe hoger de gemeenschap abundantie. Hoe hoger deze gemeenschap abundantie was voor de invasie, hoe trager de groeisnelheid van de invader en hoe lager zijn maximale invader abundantie.

In dit experiment werd de gemeenschap meer resistent tegen invasie na het verkrijgen van meerdere nutriëntenpulsen. In de praktijk zou er beter geopteerd worden voor een continu voedingsregime van laaggeconcentreerde voeding in plaats van voedingspulsen met hoge nutriëntenconcentraties. De reden hiervoor is dat een continu en traag voedingsregime grote fluctuaties van nutriëntenconcentraties vermijdt, zodat het een omgeving creëert die K-strategen (i.e. organismen die gedijen in een stabiele omgeving met een lage concentratie aan nutriënten per cel) bevoordeelt. De bacteriën in de microbiële gemeenschap houden de nutriëntenconcentraties laag door consumptie, zodat de mogelijkheden voor opportunistische r-strategen om het systeem te invaderen, worden geminimaliseerd (Defoirdt, 2016). De effectiviteit van deze mature microbiële gemeenschappen, die bestaan uit K-strategen, is reeds aangetoond in meerdere studies (Attramadal et al., 2014; Salvesen et al., 1999; Skjeramo et al., 1997). Hiernaast zijn er nog aspecten waarmee rekening moet gehouden worden, zoals spatiale organisatie. Nutriënten zijn niet homogeen verdeeld in aquacultuursystemen, maar kunnen voorkomen als hotspots met hoge nutriëntenconcentraties. Door middel van de metabole flexibiliteit en motiliteit van r-strategen om deze hotspots te exploiteren hebben ze een open niche voor invasie (Ayo et al., 2001; Defoirdt, 2016; Stocker, 2012).

4.2.4 Invloed van herhaaldelijke nutriëntenpulsen op de verblijftijd van *V. campbellii* in de microbiële gemeenschap

Met dit experiment werd nagegaan of een herhaaldelijke nutriëntenpuls ervoor kon zorgen dat de invader *V. campbellii* LMG 21363 na invasie langer in de microbiële gemeenschap zou blijven.

De conditie E die na invasie nog meerdere nutriëntenpulsen verkreeg, bereikte een hogere maximale gemeenschap en invader abundantie, maar een lagere relatieve invader abundantie dan conditie A (Figuur 24 en Figuur 25). De invloed van het herhaaldelijk toevoegen van nutriëntenpulsen op de verblijftijd van *V. campbellii* is moeilijk te concluderen, omdat het experiment hiervoor niet lang genoeg duurde. Een hypothese voor het verdere verloop is dat de invader bij conditie A, door zijn lagere absolute abundantie, sneller uit de gemeenschap zou verdwijnen. Ook zorgen nutriëntenpulsen met hoog geconcentreerde dosissen voor de selectie van r-strategen (Attramadal et al., 2014), waardoor de invader langer kan verblijven in de gemeenschap bij conditie E. Maar aan de hand van de relatieve invader abundantie kan er ook een andere hypothese opgesteld worden. De invader bij conditie E heeft op het einde van het experiment de laagste relatieve abundantie. Ook is bij conditie E de gemeenschap tot veel hogere abundanties uitgroeid, waardoor de competitie tussen de gemeenschap en de invader groter zou zijn en de invader bij deze conditie dus eerst uit de gemeenschap zou

verdwijnen. De totale duur van het experiment zou verlengd moeten worden om een eenduidig besluit te kunnen vormen.

4.3 Toekomst perspectieven

Er zijn verschillende interessante experimenten, die reeds zijn aangehaald in de preambule (§ Effect van de coronacrisis op mijn masterthesis), die op dit onderzoek kunnen volgen. Een voorbeeld hiervan is een experiment waarbij de halfwaardetijd van het GFP-eiwit wordt bepaald, om meer inzicht te krijgen in het verlies van GFP-expressie. Een tweede experiment dat de invloed van voeding verder zal onderzoeken, is de bepaling van het belang van spatiale organisatie van nutriënten op het invasiepotentieel van een invader.

Een daaropvolgend experiment dat veel informatie kan verschaffen over zowel het nutriëntenverbruik, als de interacties binnen een microbiële gemeenschap en met de invader, is de bepaling van soortrijkheid en -gelijkheid. Hierover is reeds veel gerapporteerd in de literatuur.

Naast het toedienen van voeding in aquacultuursystemen, is de desinfectie van het inlaatwater ook een frequente behandeling in de aquacultuur. De bepaling van de invloed van desinfectie op het invasiepotentieel van een invader zou ook een interessant experiment zijn.

Een laatste experiment dat op dit onderzoek kan volgen, is de bepaling van de invloed van het toevoegen van continu laaggeconcentreerde voeding ten opzichte van hoog geconcentreerde voedingspulsen op de r/K selectie in een microbiële gemeenschap.

5 Besluit

Gebaseerd op de resultaten in deze masterthesis kunnen enkele besluiten genomen worden. Op basis van de GFP-betrouwbaarheidstesten kan er besloten worden dat het model-invader systeem niet 100 % betrouwbaar is. Verlies van GFP-expressie was op te merken in functie van de tijd, over de groeicurve van *V. campbellii*, alsook in relatie met een gemengde microbiële gemeenschap. Niet alleen in deze masterthesis, maar in alle studies die werken met fluorescerende proteïnen is het dan ook belangrijk dat preliminaire testen en controles op het verlies van GFP-expressie worden ingevoerd.

Meerdere factoren blijken het invasiepotentieel van de invader te beïnvloeden. Ten eerste heeft de timing van invasie na een nutriëntenpuls een grote invloed op het invasiepotentieel van een typische r-strategie zoals *V. campbellii*. Hoe eerder de invader wordt toegevoegd na het toedienen van de nutriëntenpuls, hoe hoger de mogelijkheid voor de invader om nutriënten te verbruiken en bijgevolg hoe hoger het invasiepotentieel. Hiernaast werd de invloed van de initiële invader fysiologie nagegaan. Hieruit kan besloten worden dat ook dit een grote invloed heeft op het invasiepotentieel van de invader. Indien de invader op het moment van invasie actief groeide, werd zijn kans om de autochtone gemeenschap te invaderen vergroot.

Een volgende doelstelling was om de invloed van het toedienen van herhaaldelijke nutriëntenpulsen, zoals ook in de praktijk gebeurt, op het invasiepotentieel te kwantificeren. De conclusie uit dit experiment was dat het toevoegen van herhaaldelijke nutriëntenpulsen voor invasie, het invasiepotentieel negatief beïnvloedde. Hoe langer de autochtone gemeenschap de nutriënten kon verbruiken zonder de aanwezigheid van de invader, hoe resistenter deze gemeenschap werd tegen invasie. Als laatste werd nagegaan of de verblijftijd van de invader in de gemeenschap verlengd kon worden door toevoeging van herhaaldelijke nutriëntenpulsen. De tijdsduur van het experiment was niet lang genoeg om hierover een definitief besluit te kunnen nemen.

Dit onderzoek kan in de toekomst dienen als uitgangspunt om de eigenschappen die invasie kunnen beïnvloeden verder te onderzoeken.

6 Bibliografie

- Acosta, F., Zamor, R. M., Najar, F. Z., Roe, B. A., & Hambright, K. D. (2015). Dynamics of an experimental microbial invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(37), 11594–11599.
- Akbary, P., Hosseini, S. A., Imanpoor, M., Sudagar, M., & Makhdomi, N. M. (2010). Comparison between live food and artificial diet on survival rate, growth and body chemical composition of *Oncorhynchus mykiss* larvae. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(1), 19–32.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, Vol. 45, pp. 733–741. Academic Press.
- Albert, V., & Ransangan, J. (2013). Effect of water temperature on susceptibility of culture marine fish species to vibriosis. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*, 3(3), 48–52.
- Albrecht, M., Padrón, B., Bartomeus, I., & Traveset, A. (2014). Consequences of plant invasions on compartmentalization and species' roles in plant-pollinator networks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1788).
- Alfiansah, Y. R., Hassenrück, C., Kunzmann, A., Taslihan, A., Harder, J., & Gärdes, A. (2018). Bacterial Abundance and Community Composition in Pond Water From Shrimp Aquaculture Systems With Different Stocking Densities. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 2457.
- Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjørn, S. P., Givskov, M., & Molin, S. (1998). New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2240–2246.
- Arana, I., Irizar, A., Seco, C., Muela, A., Fernández-Astorga, A., & Barcina, I. (2003). GFP-tagged cells as a useful tool to study the survival of *Escherichia coli* in the presence of the river microbial community. *Microbial Ecology*, 45(1), 29–38.
- Attramadal, K. J. K., Øie, G., Størseth, T. R., Alver, M. O., Vadstein, O., & Olsen, Y. (2012). The effects of moderate ozonation or high intensity UV-irradiation on the microbial environment in RAS for marine larvae. *Aquaculture*, 330–333, 121–129.
- Attramadal, K. J. K., Salvesen, I., Xue, R., Øie, G., Størseth, T. R., Vadstein, O., & Olsen, Y. (2012). Recirculation as a possible microbial control strategy in the production of marine larvae. *Aquacultural Engineering*, 46(1), 27–39.
- Attramadal, K. J. K., Truong, T. M. H., Bakke, I., Skjermo, J., Olsen, Y., & Vadstein, O. (2014). RAS and microbial maturation as tools for K-selection of microbial communities improve survival in cod larvae. *Aquaculture*, 432, 483–490.
- Austin, B., & Austin, D. A. (2016). Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish. In *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Springer International Publishing.

- Ayo, B., Unanue, M., Azúa, I., Gorsky, G., Turley, C., & Iriberry, J. (2001). Kinetics of glucose and amino acid uptake by attached and free-living marine bacteria in oligotrophic waters. *Marine Biology*, 138(5), 1071–1076.
- Ayrapetyan, M., & Oliver, J. D. (2016, April 1). The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Current Opinion in Food Science*, Vol. 8, pp. 127–133. Elsevier Ltd.
- Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L., & Donelli, G. (2003). Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 89(1), 31–39.
- Bakke, I., Skjermo, J., Vo, T. A., & Vadstein, O. (2013). Live feed is not a major determinant of the microbiota associated with cod larvae (*Gadus morhua*). *Environmental Microbiology Reports*, 5(4), 537–548.
- Barberán, A., Bates, S. T., Casamayor, E. O., & Fierer, N. (2012). Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME Journal*, 6(2), 343–351.
- Bentzon-Tilia, M., Sonnenschein, E. C., & Gram, L. (2016). Monitoring and managing microbes in aquaculture – Towards a sustainable industry. *Microbial Biotechnology*, 9(5), 576–584.
- Bruno, J. F., Stachowicz, J. J., & Bertness, M. D. (2003). Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(3), 119–125.
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917–1942.
- Cappelier, J. M., Besnard, V., Roche, S., Garrec, N., Zundel, E., Velge, P., & Federighi, M. (2005). Avirulence of Viable But Non-Cultureable *Listeria monocytogenes* cells demonstrated by in vitro and in vivo models. *Veterinary Research*, 36(4), 589–599.
- Chen, Q., Yan, Q., Wang, K., Zhuang, Z., & Wang, X. (2008). Portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, and characteristics of bacterial adhesion to mucus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 80(3), 181–188.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L., & Hughson, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 415(6871), 545–549.
- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S., & Boudabous, A. (2001). Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*, 32(4), 243–247.
- Christensen, A. M., Ingerslev, F., & Baun, A. (2006). Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(8), 2208.
- Chu, W. H., & Lu, C. P. (2008). In vivo fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker. *Aquaculture*, 277(3–4), 152–155.

- Chu, W., Zhou, S., Zhu, W., & Zhuang, X. (2014). Quorum quenching bacteria *Bacillus* sp. QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection. *Scientific Reports*, 4.
- Colwell, R. R. (2000). Viable but nonculturable bacteria: A survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, Vol. 6, pp. 121–125. Springer Japan.
- Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2010). The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), no-no.
- Crab, Roselien, Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2012, August 1). Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, Vol. 356–357, pp. 351–356.
- Cremen, M. C. M., Martinez-Goss, M. R., Corre, V. L., & Azanza, R. V. (2007). Phytoplankton bloom in commercial shrimp ponds using green-water technology. *Journal of Applied Phycology*, 19(6), 615–624.
- Crooks, N. (2013). Influence of Live and Dry Diets on Growth and Survival of Chub (*Leuciscus cephalus*) Larvae. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 04(01).
- Dantas-Lima, J. J., Corteel, M., Oanh, D. T. H., Bossier, P., Sorgeloos, P., & Nauwynck, H. J. (2012). Development of two haemocyte culture systems (in attachment and in suspension) for shrimp immunity studies. *Aquaculture*, 366–367, 17–26.
- Darshanee Ruwandeepika, H. A., Sanjeewa Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2012). Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of *vibrios* belonging to the *Harveyi* clade. *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 59–74.
- Davis, M. A., Grime, J. P., & Thompson, K. (2000). Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. *Journal of Ecology*, 88(3), 528–534.
- De Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity*, Vol. 68, pp. 4839–4849.
- De Roy, K., Marzorati, M., Negroni, A., Thas, O., Balloi, A., Fava, F., Verstraete, W., Daffonchio, D., & Boon, N. (2013). Environmental conditions and community evenness determine the outcome of biological invasion. *Nature Communications*, 4, 1383–1385.
- De Schryver, P., Defoirdt, T., & Sorgeloos, P. (2014). Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? *PLoS Pathogens*, 10(4), e1003919.
- De Schryver, P., & Vadstein, O. (2014). Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *ISME Journal*, 8(12), 2360–2368.
- Defoirdt, T. (2016). Implications of Ecological Niche Differentiation in Marine Bacteria for Microbial Management in Aquaculture to Prevent Bacterial Disease. *PLoS Pathogens*, 12(11), 1–5.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2008). Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: Lessons learned from in vivo work. *ISME Journal*, 2(1), 19–26.

- Di Pinto, A., Terio, V., Novello, L., & Tantillo, G. (2011). Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 22(1), 124–127.
- Dong, X., Wang, H., Xie, G., Zou, P., Guo, C., Liang, Y., & Huang, J. (2017). An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the *pir^{VP}* gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerging Microbes & Infections*, 6(1), 1–3.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 15, pp. 167–193.
- Donnenberg, M. S. (2000, August 17). Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature*, Vol. 406, pp. 768–774.
- Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A., Li, Y., & Wang, Y. (2007). Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1349–1354.
- Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., & Cutting, S. M. (2004). Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2161–2171.
- Eisenhauer, N., Schulz, W., Scheu, S., & Jousset, A. (2013). Niche dimensionality links biodiversity and invasibility of microbial communities. *Functional Ecology*, 27(1), 282–288.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., & Cuzo, G. (2013). Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. In *Biomass Now - Cultivation and Utilization*. InTech.
- Errampalli, D., Leung, K., Cassidy, M. B., Kostrzynska, M., Blears, M., Lee, H., & Trevors, J. T. (1999, April 1). Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 35, pp. 187–199. Elsevier.
- Fargione, J. E., & Tilman, D. (2005). Diversity decreases invasion via both sampling and complementarity effects. *Ecology Letters*, 8(6), 604–611.
- Farmer, J. J. (2006). The Family *Vibrionaceae*. In *The Prokaryotes* (pp. 495–507). Springer New York.
- Finlay, B. B., & Falkow, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiological Reviews*, Vol. 53, pp. 210–230.
- Gabriel, M. W., Matsui, G. Y., Friedman, R., & Lovell, C. R. (2014). Optimization of multilocus sequence analysis for identification of species in the genus *Vibrio*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5359–5365.
- Gatesoupe, F.-J. (1994). Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *vibrio*. In *Gatesoupe F. J. Aquat. Living Resour* (Vol. 7).

- Hammes, F., & Egli, T. (2010, June). Cytometric methods for measuring bacteria in water: Advantages, pitfalls and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 397, pp. 1083–1095. Elsevier Ltd.
- Hargreaves, J. A. (2006). Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 344–363.
- Harris, L., Owens, L., & Smith, S. (1996). A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3548.
- Higgins, D. A., Pomianek, M. E., Kraml, C. M., Taylor, R. K., Semmelhack, M. F., & Bassler, B. L. (2007). The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature*, 450(7171), 883–886.
- Hillebrand, H., Bennett, D. M., & Cadotte, M. W. (2008). Consequences of dominance: A review of evenness effects on local and regional ecosystem processes. *Ecology*, 89(6), 1510–1520.
- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(1), 3–22.
- Jones, M. L., Ramoneda, J., Rivett, D. W., & Bell, T. (2017). Biotic resistance shapes the influence of propagule pressure on invasion success in bacterial communities. *Ecology*, 98(7), 1743–1749. Ecological Society of America.
- Karunasagar, I., Pai, R., & Malathi, G. R. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128(3–4), 203–209.
- Kennedy, T. A., Naeem, S., Howe, K. M., Knops, J. M. H., Tilman, D., & Reich, P. (2002). Biodiversity as a barrier to ecological invasion. *Nature*, 417(6889), 636–638.
- Kinnunen, M., Dechesne, A., Proctor, C., Hammes, F., Johnson, D., Quintela-Baluja, M., Graham, D., Daffonchio, D., Fodelianakis, S., Hahn, N., Boon, N., & Smets, B. F. (2016). A conceptual framework for invasion in microbial communities. *ISME Journal*, 10(12), 2773–2779.
- Kokashvili, T., Whitehouse, C. A., Tskhvediani, A., Grim, C. J., Elbakidze, T., Mitaishvili, N., Janelidze, N., Jaiani, E., Haley, B. J., Lashkhi, N., Huq, A., Colwell, R. R., & Tediashvili, M. (2015). Occurrence and Diversity of Clinically Important *Vibrio* Species in the Aquatic Environment of Georgia. *Frontiers in Public Health*, 3.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., & Divanach, P. (2012). Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43(10), 1520–1527.
- Kondo, H., Van, P. T., Dang, L. T., & Hirono, I. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announcements*, 3(5).
- Kuebbing, S., Rodriguez-Cabal, M. A., Fowler, D., Breza, L., Schweitzer, J. A., & Bailey, J. K. (2013). Resource availability and plant diversity explain patterns of invasion of an exotic grass. *Journal of Plant Ecology*, 6(2), 141–149.

- Le Meur, N., Hahne, F., Ellis, B., & Haaland, P. (2019). flowCore: data structures package for flow cytometry data.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 5, pp. 1–1. Frontiers Research Foundation.
- Li, W., & Stevens, M. H. H. (2012). Fluctuating resource availability increases invasibility in microbial microcosms. *Oikos*, 121(3), 435–441.
- Lightner, D. V, Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L., & Tran, L. (2012). Early Mortality Syndrome Affects Shrimp In Asia.
- Lindbäck, T., Rottenberg, M. E., Roche, S. M., & Rørvik, L. M. (2010). The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Veterinary Research*, 41(1).
- Lio-Po, G. D., Leaño, E. M., Peñaranda, M. M. D., Villa-Franco, A. U., Sombito, C. D., & Guanzon, N. G. (2005). Anti-luminous *Vibrio* factors associated with the “green water” grow-out culture of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 250(1–2), 1–7.
- Lopez-Roldan, R., Tusell, P., Cortina, J. L., Courtois, S., & Cortina, J. L. (2013, March 1). On-line bacteriological detection in water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 44, pp. 46–57. Elsevier B.V.
- Lowder, M., Unge, A., Maraha, N., Jansson, J. K., Swiggett, J., & Oliver, J. D. (2000). Effect of starvation and the viable-but-nonculturable state on green fluorescent protein (GFP) fluorescence in GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* A506. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3160–3165.
- Lv, X. C., Li, Y., Qiu, W. W., Wu, X. Q., Xu, B. X., Liang, Y. T., Liu, B., Chen, S. J., Rao, P. F., & Ni, L. (2016). Development of propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR (PMA-qPCR) assays to quantify viable dominant microorganisms responsible for the traditional brewing of Hong Qu glutinous rice wine. *Food Control*, 66, 69–78.
- Machado, H., & Gram, L. (2015). The *fur* gene as a new phylogenetic marker for *Vibrionaceae* species identification. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8), 2745–2752.
- Mahmoudzadeh, H., Ahmadi, M. r., & Shamsaei, M. (2009). Comparison of rotifer *Brachionus plicatilis* as a choice of live feed with dry feed in rearing *Coregonus lavaretus* fry. *Aquaculture Nutrition*, 15(2), 129–134.
- Mallon, C. A., Poly, F., Le Roux, X., Marring, I., van Elsas, J. D., & Salles, J. F. (2015). Resource pulses can alleviate the biodiversity–invasion relationship in soil microbial communities. *Ecology*, 96(4), 915–926.
- Mallon, C. A., Van Elsas, J. D., & Salles, J. F. (2015). Microbial invasions: The process, patterns, and mechanisms. *Trends in Microbiology*, 23(11), 719–729.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Herмосillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, 1–13.

- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 165–199.
- Mohamed, K. S., Kripa, Asokan, P. K., Sasikumar, G., Venkatesan, Jenni, B., Alloyicious, P. S., Chinnadurai, S., Ragesh, N. K., & Prema, D. (2016). Development of bivalve farming as a source of income generation for women's self-helpgroups in coastal India.
- Möller, L., Kreikemeyer, B., Luo, Z. H., Jost, G., & Labrenz, M. (2020). Impact of coastal aquaculture operation systems in Hainan island (China) on the relative abundance and community structure of *Vibrio* in adjacent coastal systems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 233, 106542.
- Müller, A. L., De Rezende, J. R., Hubert, C. R. J., Kjeldsen, K. U., Lagkouvardos, I., Berry, D., Jørgensen, B. B., & Loy, A. (2014). Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents. *ISME Journal*, 8(6), 1153–1165.
- Muthukrishnan, S., Defoirdt, T., Ina-Salwany, M. Y., Yusoff, F. M., Shariff, M., Ismail, S. I., & Natrah, I. (2019). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. *Aquaculture*, 511, 734227.
- Muthukrishnan, S., Defoirdt, T., Shariff, M., Ina-Salwany, M., Fatimah, M. Y., & Natrah, I. (2019). Horizontal gene transfer of the *pirAB* genes responsible for Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) turns a non-*Vibrio* strain into an AHPND-positive pathogen. *BioRxiv*, (December), 2019.12.20.884320.
- Naeem, S., Knops, J. M. H., Tilman, D., Howe, K. M., Kennedy, T., & Gale, S. (2000). Plant diversity increases resistance to invasion in the absence of covarying extrinsic factors. *Oikos*, 91(1), 97–108.
- Natrah, F.M.I., Kenmegne, M. M., Wiyoto, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Aquaculture*, 317(1–4), 53–57.
- Natrah, Fatin M. I., Bossier, P., Sorgeloos, P., Yusoff, F. M., & Defoirdt, T. (2014). Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1), 48–61.
- Natrah, Ruwandeeepika, H. A. D., Pawar, S., Karunasagar, I., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Veterinary Microbiology*, 154(1–2), 124–129.
- Nishiguchi, M. K., & Nair, V. S. (2003). Evolution of symbiosis in the *Vibrionaceae*: A combined approach using molecules and physiology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 2019–2026.
- O'Dowd, D. J., Green, P. T., & Lake, P. S. (2003). Invasional “meltdown” on an oceanic island. *Ecology Letters*, 6(9), 812–817.
- Okey, I. B., Gabriel, U. U., & Deekae, S. N. (2018). The Use of Synbiotics (Prebiotic and Probiotic) in Aquaculture Development. *Sumerianz Journal of Biotechnology*, 1(2), 51–60.
- Oliver, J. D. (1995). The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters*, 133(3), 203–208.

- Packiavathy, I. A. S. V., Sasikumar, P., Pandian, S. K., & Veera Ravi, A. (2013). Prevention of quorum-sensing-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio* spp. by curcumin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23), 10177–10187.
- Padrón, B., Traveset, A., Biedenweg, T., Díaz, D., Nogales, M., & Olesen, J. M. (2009). Impact of Alien Plant Invaders on Pollination Networks in Two Archipelagos. *PLoS ONE*, 4(7), e6275.
- Pandiyani, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E. G. J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., & Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, Vol. 5, pp. 55–59. JPR Solutions.
- Phuoc, L. H., Corteel, M., Thanh, N. C., Nauwynck, H., Pensaert, M., Alday-Sanz, V., den Broeck, W. Van, Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2009). Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 290(1–2), 61–68.
- Pridgeon, J. W., & Klesius, P. H. (2012). Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 7(048).
- Props, R., Monsieurs, P., Mysara, M., Clement, L., & Boon, N. (2016). Measuring the biodiversity of microbial communities by flow cytometry. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1376–1385.
- R Core team. (2008). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Retrieved from <http://www.gnu.org/copyleft/gpl.html>.
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G. P., & Shinoda, S. (2014, July 31). Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in Public Health*, Vol. 2, p. 103. Frontiers Media S. A.
- Rawls, J. F., Mahowald, M. A., Ley, R. E., & Gordon, J. I. (2006). Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell*, 127(2), 423–433.
- Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaan, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Reyes Muñoz, A. (2018). *Pir^{VP}* genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14.
- Ringø, E., & Gatesoupe, F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture*, 160(3–4), 177–203.
- Rowan, N. J. (2004). Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? *Trends in Food Science and Technology*, 15(9), 462–467.
- Salvesen, I., Skjermo, J., & Vadstein, O. (1999). Growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during first feeding in relation to the proportion of r/K-strategists in the bacterial community of the rearing water. *Aquaculture*, 175(3–4), 337–350.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., & Thompson, F. L. (2007). Inferring the evolutionary history of *vibriosis* by means of multilocus sequence analysis. *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7932–7936.

- Simidu, U., & Tsukamoto, K. (1980). A method of the selective isolation and enumeration of marine *Vibrionaceae*. *Microbial Ecology*, 6(2), 181–184.
- Skjermo, J., Salvesen, I., Øie, G., Olsen, Y., & Vadstein, O. (1997). Microbially matured water: A technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture International*, 5(1), 13–28.
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4(1), 89–101.
- Soumya Haldar, S. C. (2012). *Vibrio* Related Diseases in Aquaculture and Development of Rapid and Accurate Identification Methods. *Journal of Marine Science: Research & Development*, s1.
- Stocker, R. (2012). Marine microbes see a sea of gradients. *Science*, Vol. 338, pp. 628–633. American Association for the Advancement of Science.
- Svitil, A. L., Ní Chadhain, S. M., Moore, J. A., & Kirchman, D. L. (1997). Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 408–413.
- Swartzman, E., Silverman, M., & Meighen, E. A. (1992). The *luxR* gene product of *Vibrio harveyi* is a transcriptional activator of the *lux* promoter. *Journal of Bacteriology*, Vol. 174, pp. 7490–7493.
- Taga, M. E., & Bassler, B. L. (2003). Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14549–14554.
- Tendencia, E. A., Bosma, R. H., & Sorio, L. R. (2012). Effect of three innovative culture systems on water quality and whitespot syndrome virus (WSSV) viral load in WSSV-fed *Penaeus monodon* cultured in indoor tanks. *Aquaculture*, 350–353, 169–174.
- Tendencia, E. A., & de la Peña, M. R. (2010). Effect of Different Sizes of Saline Red Tilapia Hybrid *Oreochromis niloticus* Linnaeus x *O. mossambicus* Peters on the Growth of Luminous Bacteria *Vibrio harveyi*.
- Thiennimitr, P., Winter, S. E., Winter, M. G., Xavier, M. N., Tolstikov, V., Huseby, D. L., Sterzenbach, T., Tsolis, R. M., Roth, J. R., & Bäumler, A. J. (2011). Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42), 17480–17485.
- Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C. B., & Swings, J. (2005). Phylogeny and molecular identification of *vibriosis* on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5107–5115.
- Thompson, Fabiano L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., & Swings, J. (2001). Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4), 520–538.

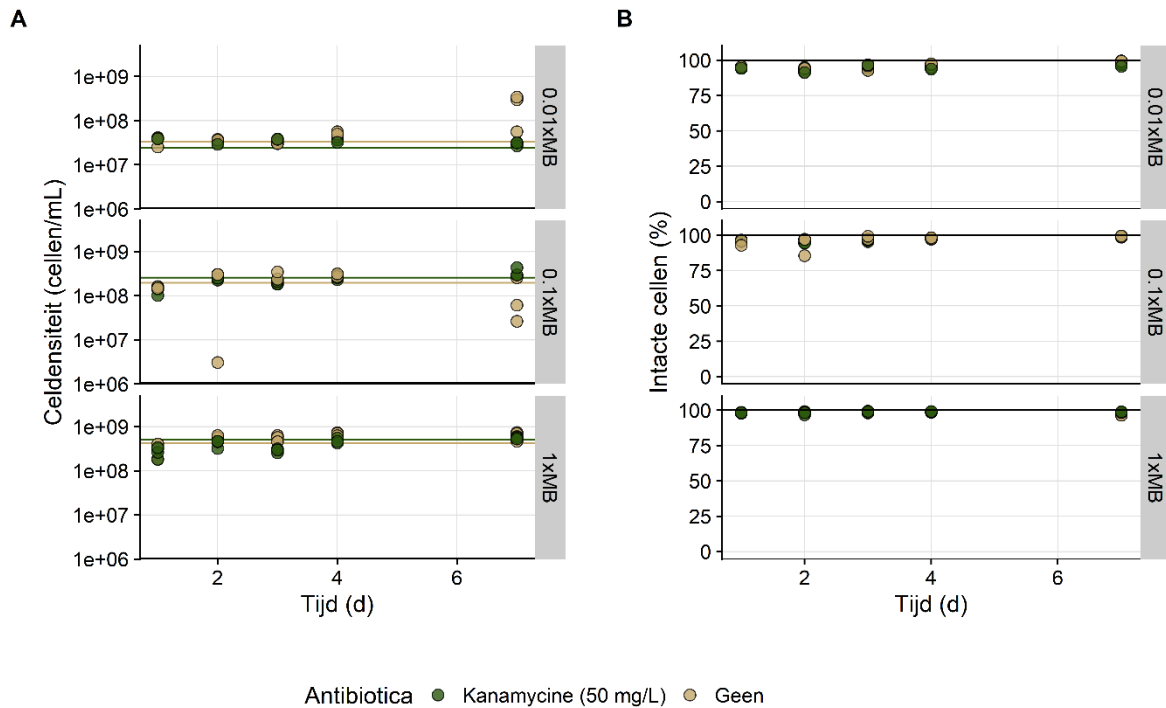
- Tombolini, R., Unge, A., Davey, M. E., Bruijn, F. J., & Jansson, J. K. (2006). Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(1), 17–28.
- Troell, M., Naylor, R. L., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P. H., Folke, C., Arrow, K. J., Barrett, S., Crépin, A. S., Ehrlich, P. R., Gren, Å., Kautsky, N., Levin, S. A., Nyborg, K., Österblom, H., Polasky, S., Scheffer, M., Walker, B. H., Xepapadeas, T., et al. (2014). Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(37), 13257–13263.
- Tu, K. C., & Bassler, B. L. (2007). Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes and Development*, 21(2), 221–233.
- Vadstein, O., Bergh, Ø., Gatesoupe, F.-J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., Picchietti, S., Scapigliati, G., Makridis, P., Olsen, Y., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., De Schryver, P., & Bossier, P. (2013). Microbiology and immunology of fish larvae. *Reviews in Aquaculture*, 5(SUPPL.1), S1–S25.
- Van Nevel, S., De Roy, K., & Boon, N. (2013). Bacterial invasion potential in water is determined by nutrient availability and the indigenous community. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3), 593–603.
- Van Nevel, S., Koetzsch, S., Proctor, C. R., Besmer, M. D., Prest, E. I., Vrouwenvelder, J. S., Knezev, A., Boon, N., & Hammes, F. (2017, April 15). Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Research*, Vol. 113, pp. 191–206. Elsevier Ltd.
- Venkat, H. K., Sahu, N. P., & Jain, K. K. (2004). Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 35(5), 501–507.
- Verthé, K., Possemiers, S., Boon, N., Vaneechoutte, M., & Verstraete, W. (2004). Stability and activity of an *Enterobacter aerogenes*-specific bacteriophage under simulated gastrointestinal conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), 465–472.
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346.
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2006). The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes and Development*, 20(19), 2754–2767.
- Wikfors, G. H. (2004). Live Feeds in Marine Aquaculture. *Journal of Phycology*, 40(5), 999–1000.
- Wilson, E. O., & MacArthur, R. H. (1988). The Theory of Island Biogeography - Highlights. *Princeton University Press: Princeton*, 413(6857).
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by *pirAB*-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.

Yang, T., Wei, Z., Friman, V. P., Xu, Y., Shen, Q., Kowalchuk, G. A., & Jousset, A. (2017). Resource availability modulates biodiversity-invasion relationships by altering competitive interactions. *Environmental Microbiology*, 19(8), 2984–2991.

7 Bijlagen

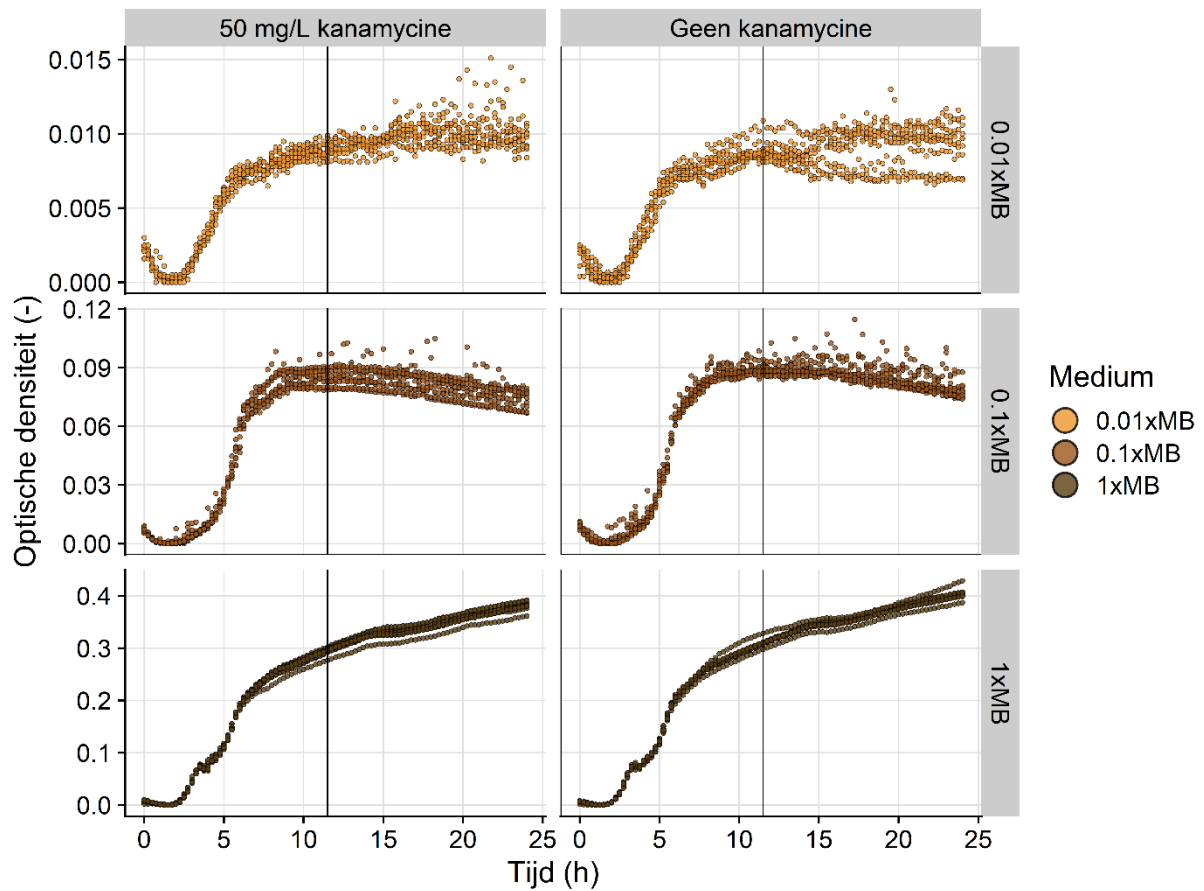
7.1 Experiment 1: Validatie van het modelsysteem

7.1.1 GFP-betrouwbaarheid over de tijd

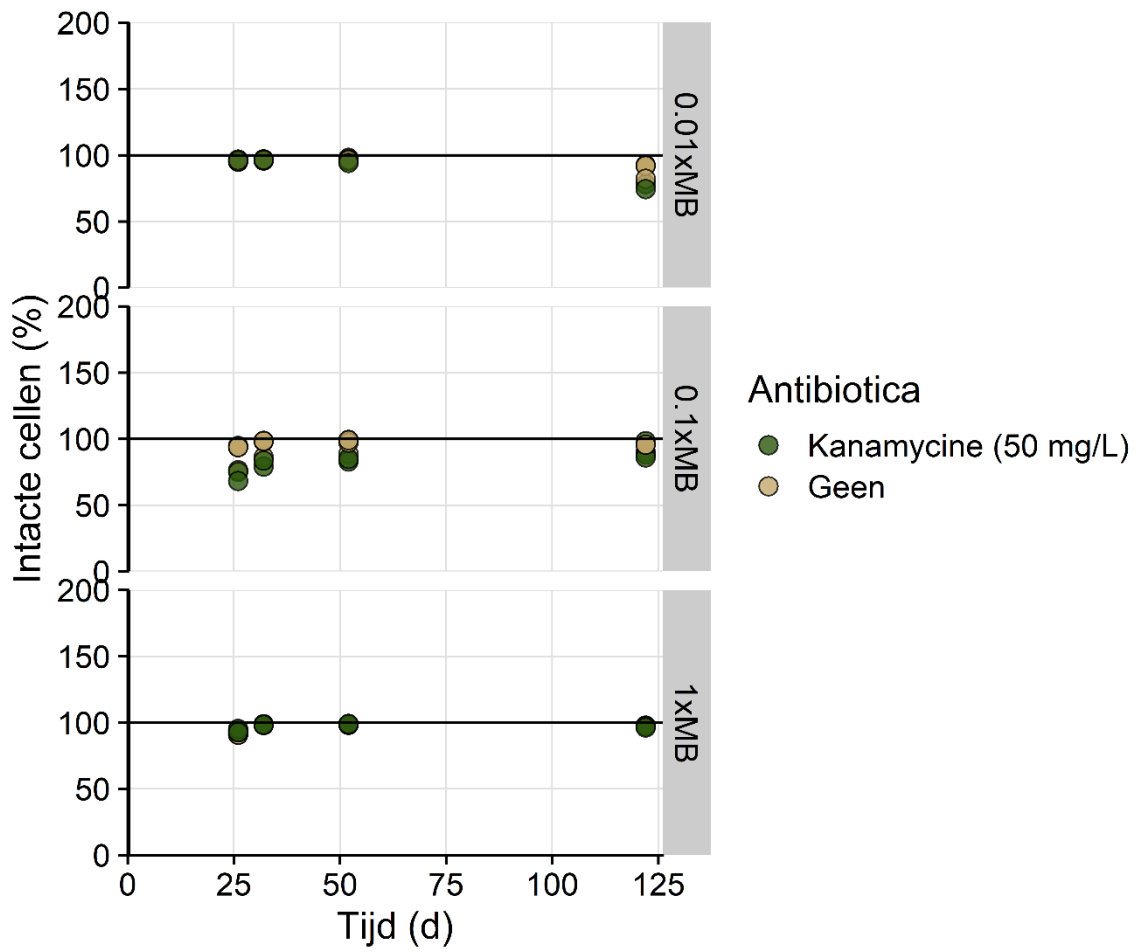


Extra figuur 1: De celdensiteiten (A) en het percentage intacte cellen (B) in functie van de tijd, in de aan- en afwezigheid van kanamycine, onder de verschillende nutriëntencondities. Er waren biologische replicaten voor elke conditie ($n = 3$). De lijnen in paneel A geven de gemiddelde densiteiten van de replicaten aan.

7.1.2 GFP-betrouwbaarheid over de groeicurve van *V. campbellii* LMG 21363

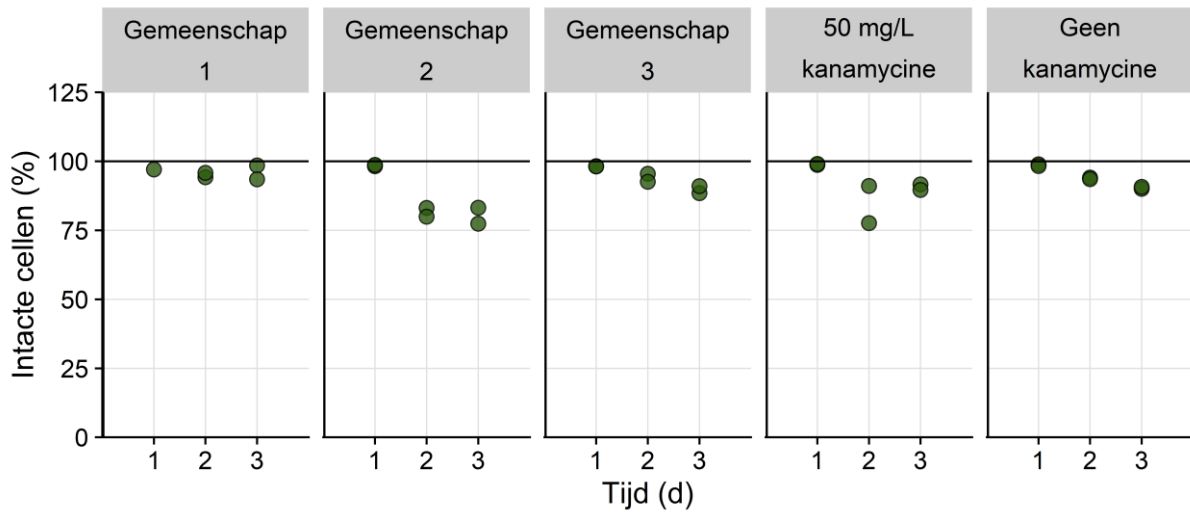


Extra figuur 2: Groeicurven van *V. campbellii* in de drie verschillende media en in de aan- en afwezigheid van kanamycine, in het experiment waarbij de GFP-betrouwbaarheid werd opgevolgd over de tijd. De verticale lijn geeft aan wanneer alle culturen in stationaire fase terechtkwamen ($t = 11.5\text{h}$). Er waren biologische replicaten voor elke conditie ($n = 9$).

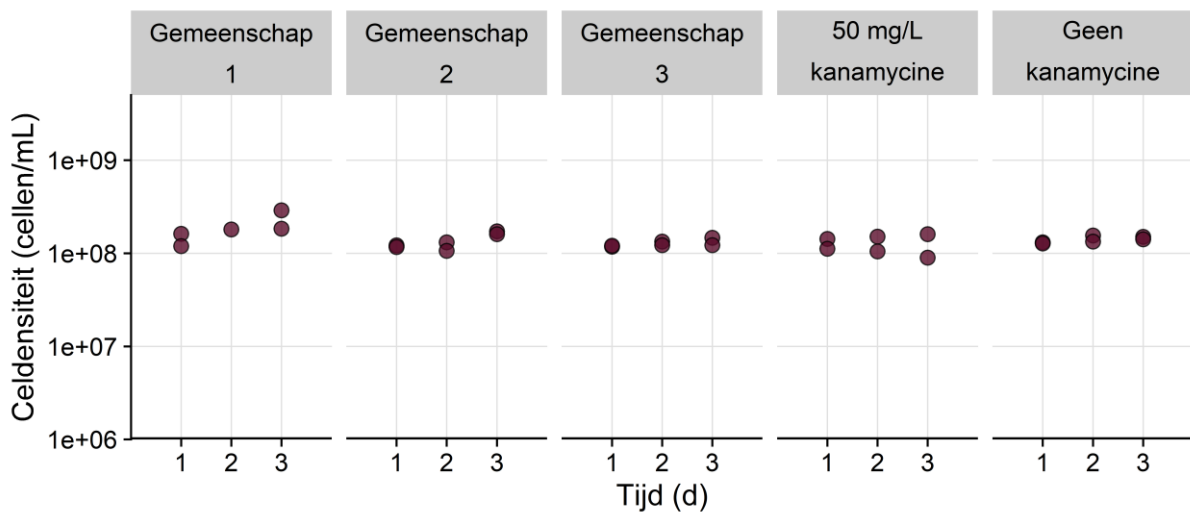


Extra figuur 3: Het percentage intacte cellen in de drie verschillende media en in de aan- en afwezigheid van kanamycine over de groeicurve van *V. campbellii*. Er waren biologische replicaten voor elke conditie (n = 3).

7.1.3 GFP-betrouwbaarheid wanneer *V. campbellii* LMG 21363 interageert met een gemende gemeenschap

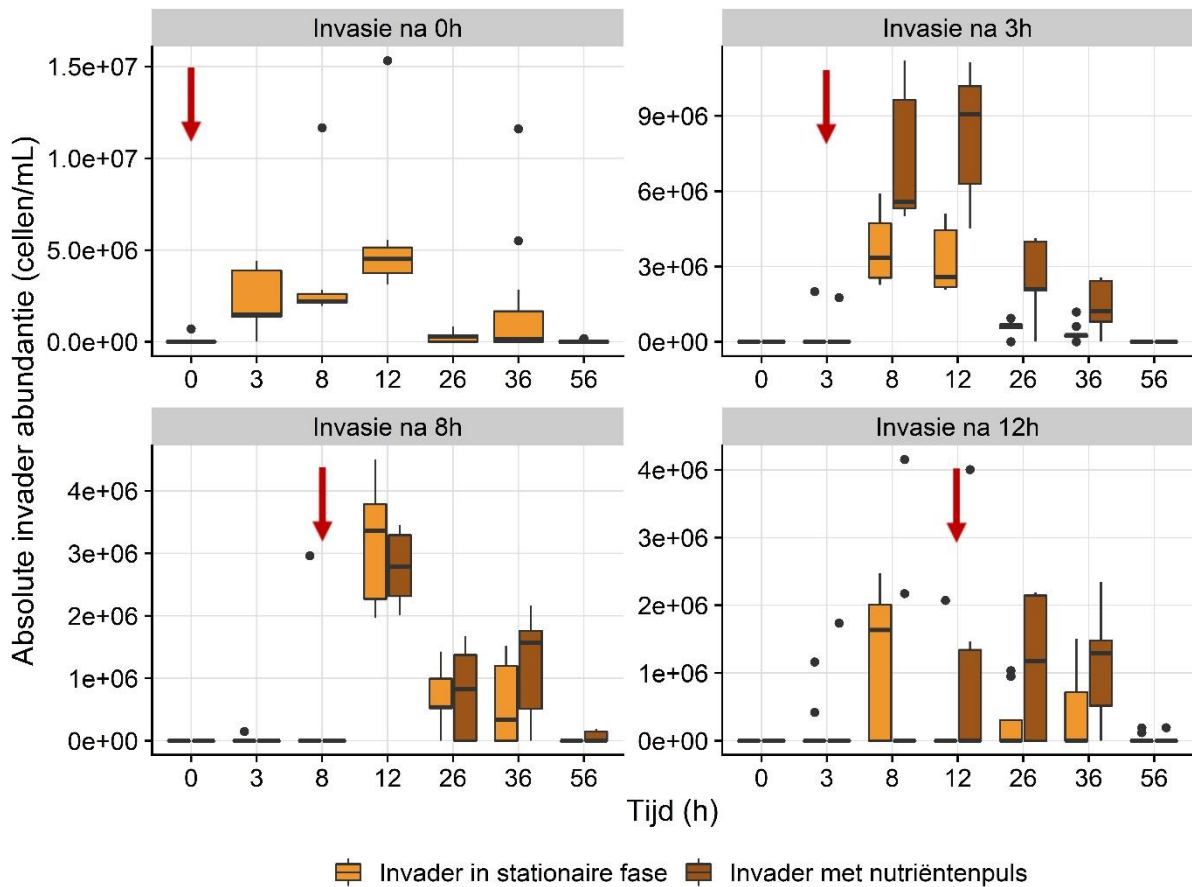


Extra figuur 4: Het percentage intacte cellen in functie van de tijd en onderverdeeld over de verschillende geteste condities. Er waren biologische duplicaten voor elke conditie (n = 2).



Extra figuur 5: De totale celdensiteiten in functie van de tijd en onderverdeeld over de verschillende geteste condities. Er waren biologische duplicaten voor elke conditie (n = 2).

7.2 Experiment 2: Invasie na nutriëntenpulsen

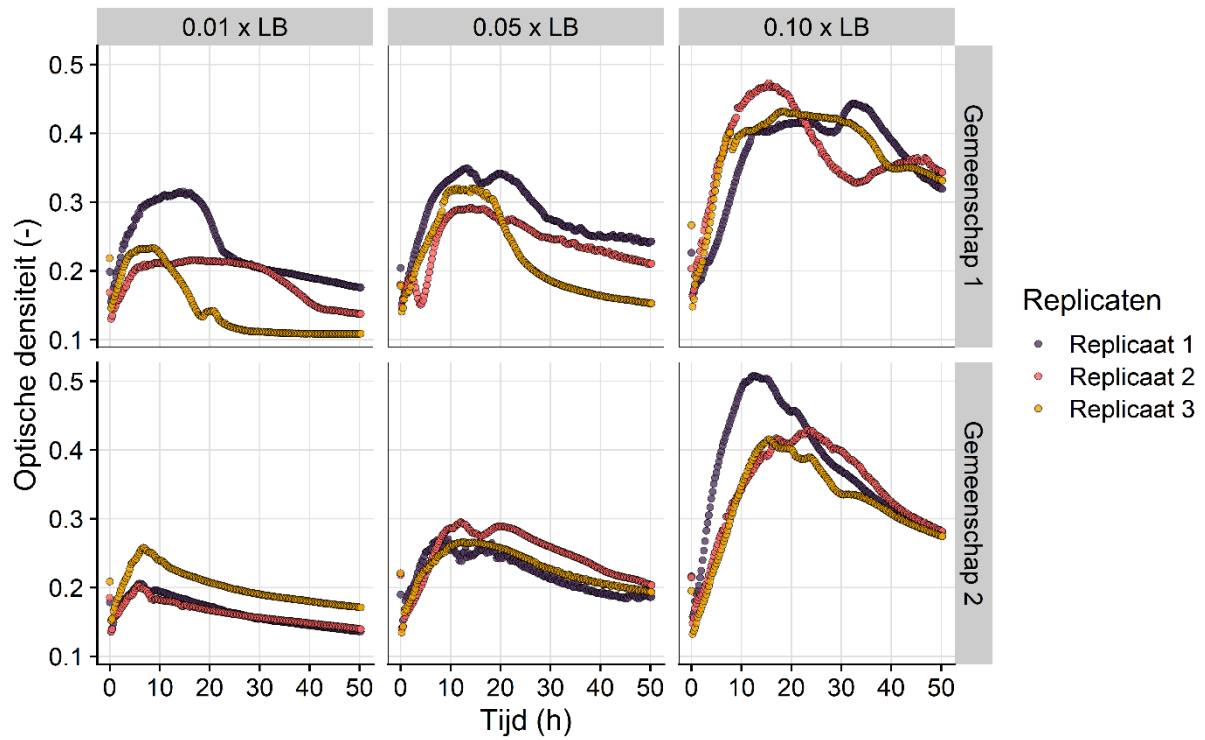


Extra figuur 6: Absolute invader abundantie van de stationaire invader en de invader met nutriëntenpuls over de tijd (met verschillende y-assen per paneel) bij vier verschillende invasietijdspunten ($t_1 = 0\text{h}$, $t_2 = 3\text{h}$, $t_3 = 8\text{h}$, $t_4 = 12\text{h}$ na de initiële nutriëntenpuls). Er waren technische ($n = 3$) en biologische ($n = 3$) replicaten per conditie. De rode pijlen duiden de timing van invasie aan.

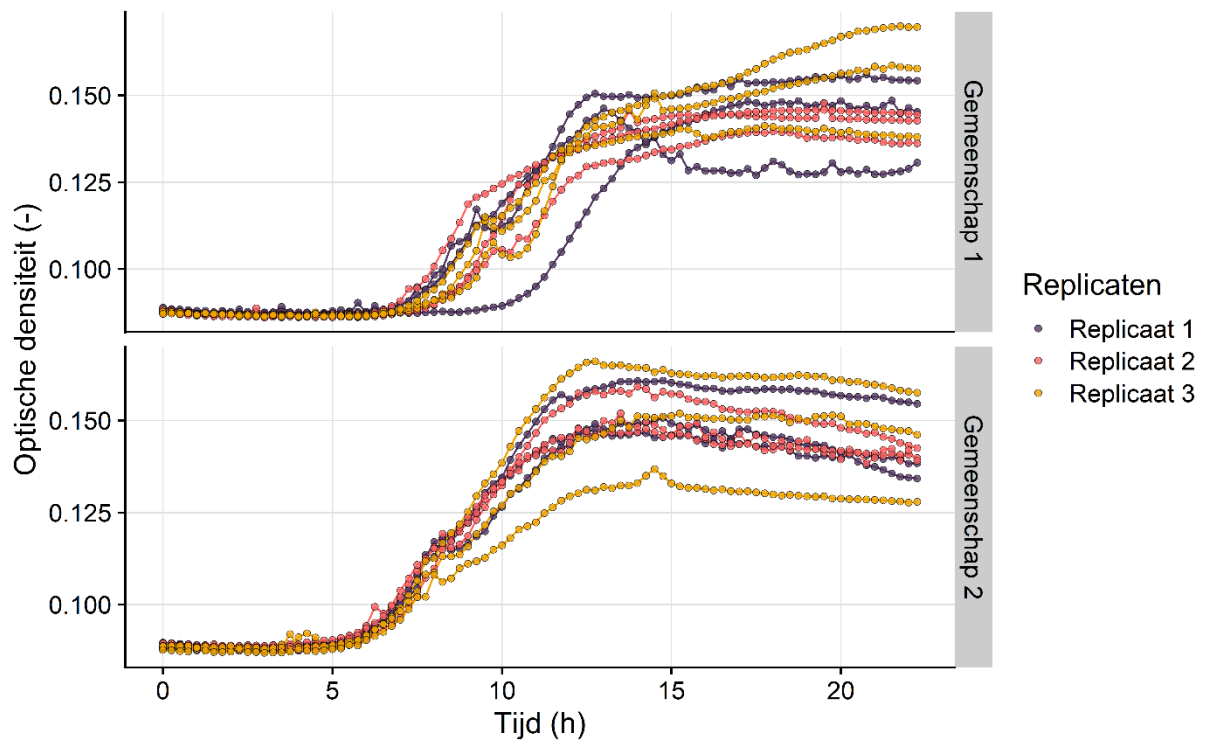
Controle van de eventuele invloed door toevoeging van de invader met nutriëntenpuls

Gemiddeld werd voor een invasie 40 μL *V. campbellii* cultuur toegevoegd aan een gemeenschap van 2 mL om een invasie uit te voeren waarbij de celdensiteit van de invader 10^6 cellen/mL bedroeg. Om na te gaan of toevoeging van de invader met nutriëntenpuls (of de stationaire invader) niet resulteerde in een extra nutriëntenpuls naast zijn invasie, werd het percentage van nutriëntentoevoeging door het toevoegen van de invaders berekend. De stationaire invader zorgde voor een nutriëntentoevoeging van 0.2 % en de invader met nutriëntenpuls zorgde voor een nutriëntentoevoeging van 1.2 %. Er kan besloten worden dat de toevoeging van een invader cultuur geen invloed had op de totale nutriëntenhoeveelheid.

Preliminare groeicurven



Extra figuur 7: De preliminare groeicurven van de gemengde gemeenschap (opgegroeid door 10-maal te verdunnen in LB/100 + 35 g/L IO) na toevoegen van een nutriëntepuls van 0.01 x LB, 0.05 x LB of 0.10 x LB. Er waren drie technische replicaten per conditie (n = 3).



Extra figuur 8: De preliminaire groeicurven van de initiële groei van de gemengde gemeenschappen na 10-maal te verdunnen in LB/100 + 35 g/L medium. Er waren technische (n = 3) en biologische (n = 3) replicaten per conditie.

7.3 Experiment 3: Invasie na herhaaldelijke nutriëntenpulsen

Preliminare test

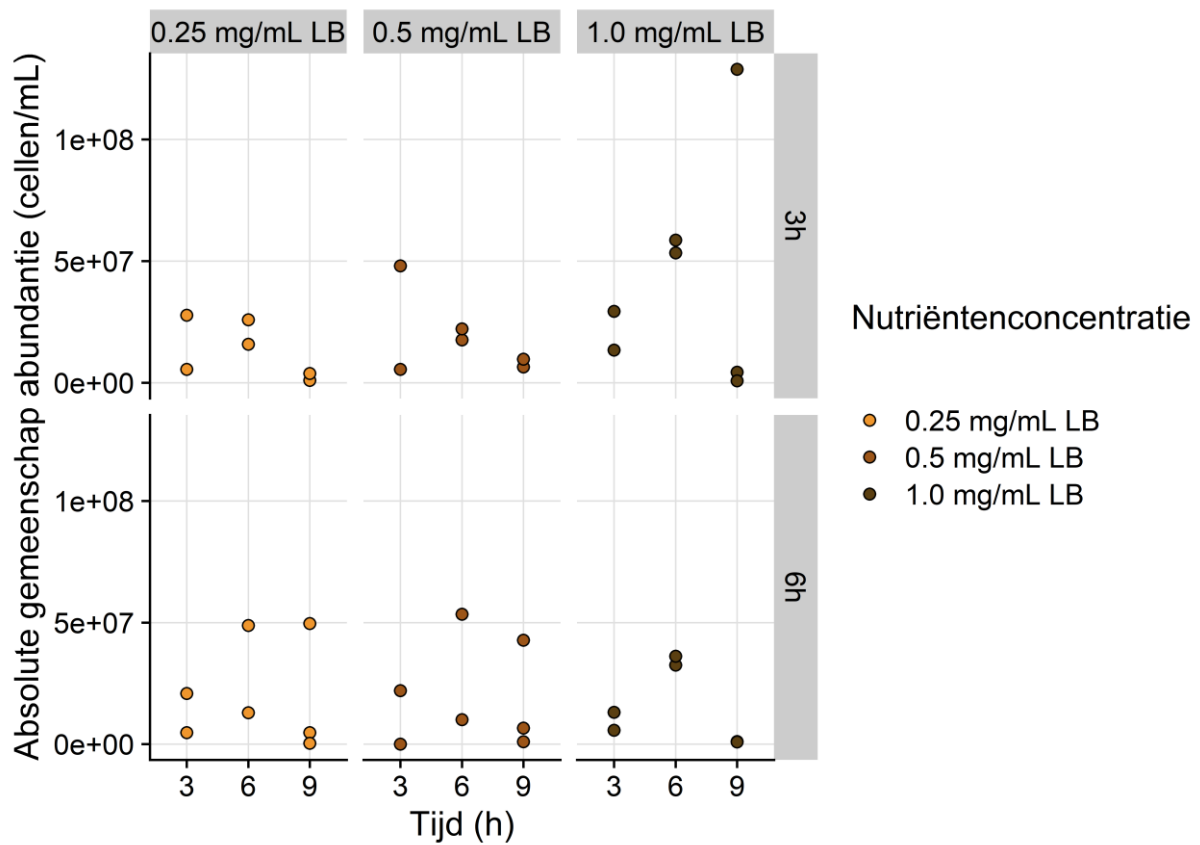
Een preliminaire test werd uitgevoerd om na te gaan welke combinatie van nutriëntenconcentratie voor de nutriëntenpuls en welke timing voor de nutriëntentoevoeging de meest optimale en constante resultaten vertoonde. De twee timings die gekozen werden om de nutriënten toe te dienen, waren om de 3 uur en om de 6 uur. De drie gekozen nutriëntenconcentraties waren 0.25 mg/mL LB, 0.5 mg/mL LB en 1.0 mg/mL LB. De gecombineerde condities werden getest in een gemeenschap en in dezelfde gemeenschap die geïnvadeerd was met *V. campbellii*. De gemeenschap en de *V. campbellii* cultuur werden op dezelfde manier voorbereid als in: 2.2.2 Experiment 2: Invasie na nutriëntenpulsen en het belang van invader fysiologie.

De verschillende condities werden voorbereid in 24-well platen (2 mL per well) in biologische triplicaten per conditie. De replicaten werden gerandomiseerd over de platen om plaat-effecten in de resultaten te vermijden. Voor elke invasie en nutriëntenpuls werden stalen genomen en geanalyseerd via flow cytometrie waarbij het totaal aantal cellen en het aantal GFP-positieve cellen werden bepaald. De celdensiteit van de *V. campbellii* cultuur werd voor de initiële invasie bepaald door flow cytometrie en de hoeveelheid volume die nodig was om een invasie van 10^6 cellen/mL uit te voeren, werd bepaald.

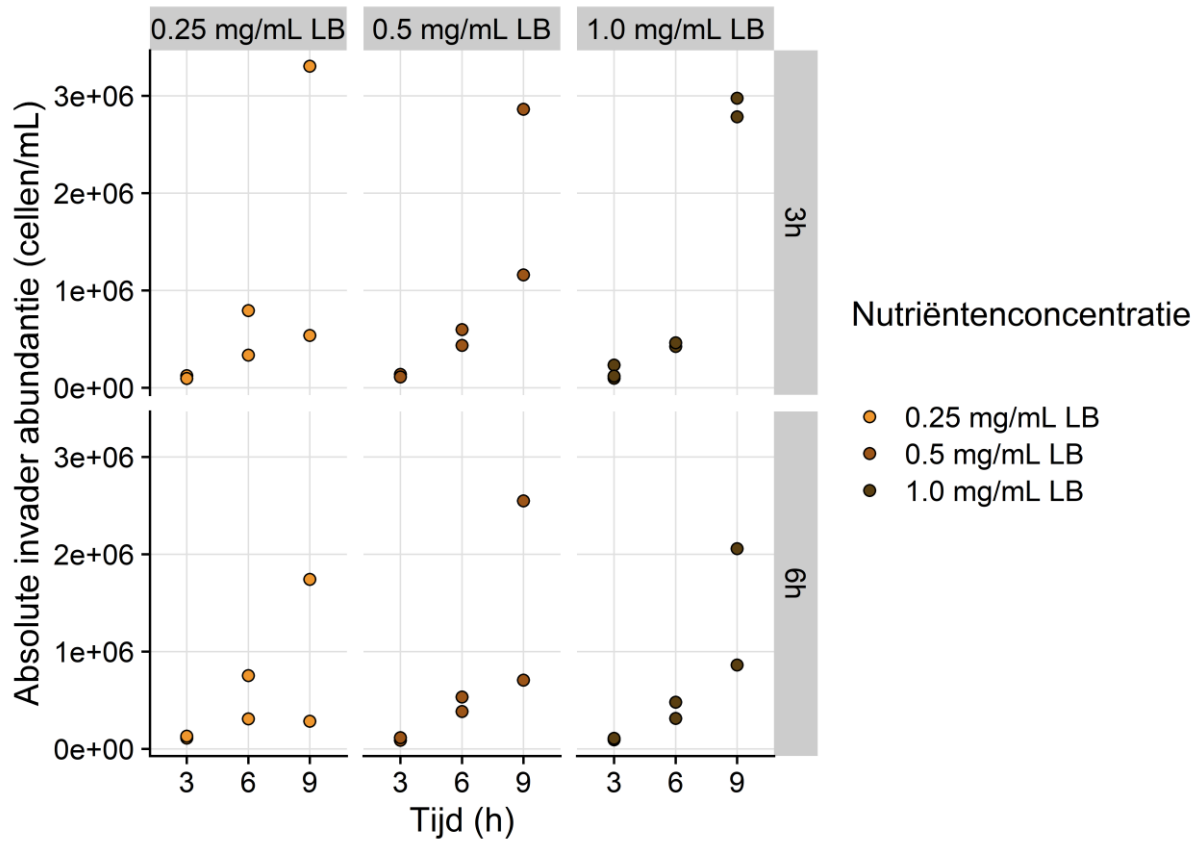
Tussen elk tijdstip werden de platen bewaard in een 28°C incubator met shaking (60 rpm) om de nutriënten zo homogeen mogelijk te verdelen.

In parallel werd als controle de optische dichtheid (OD) bij 600 nm gemeten met behulp van een Tecan Infinite[®] M200 PRO multiwell-plaatlezer (Tecan Trading AG, Zwitserland) met tijdsintervallen van 5 minuten over een totale periode van 24 uur. De temperatuur werd ingesteld op 28°C.

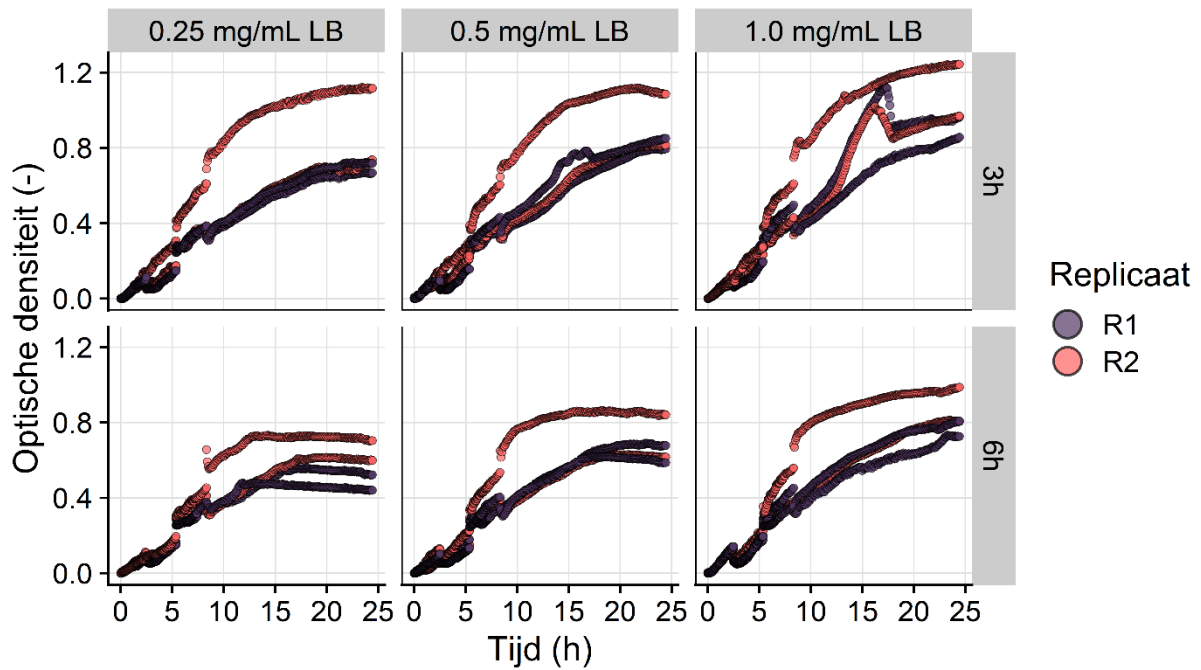
Resultaten



Extra figuur 9: De absolute gemeenschap abundantie onderverdeeld in de drie geteste nutriëntenconcentraties van de nutriëntenpulsen en de twee geteste nutriënt timings in functie van de tijd. Er waren biologische duplicaten voor elke conditie (n = 2).

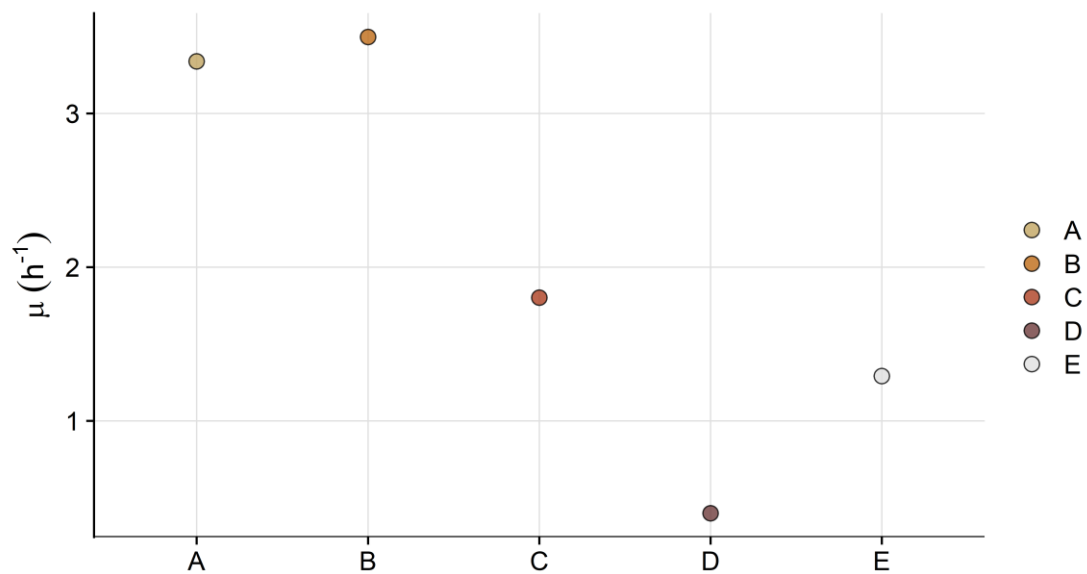


Extra figuur 10: De absolute invader abundantie onderverdeeld in de drie geteste nutriëntenconcentraties van de nutriëntenpulsen en de twee geteste nutriënt timings in functie van de tijd. Er waren biologische duplicaten voor elke conditie (n = 2).



Extra figuur 11: De groeicurven van *V. campbellii* onderverdeeld in de drie geteste nutriëntconcentraties van de nutriëntpulsen en de twee geteste nutriënt timings in functie van de tijd. Er waren technische (n = 2) en biologische (n = 3) replicaten per conditie.

Experiment: Invasie na herhaaldelijke nutriëntpulsen



Extra figuur 12: De berekende gemiddelde groeisnelheden van *V. campbellii* over de verschillende condities. Conditie A: invasie op 0h en nutriëntpuls op 0h; Conditie B: invasie op 3h en nutriëntpuls op 0h en 3h; Conditie C: invasie op 6h en nutriëntpuls op 0h, 3h en 6h; Conditie D: invasie op 9h en nutriëntpuls op 0h, 3h, 6h en 9h; Conditie E: invasie op 0h en nutriëntpuls op 0h, 3h, 6h en 9h. Er waren biologische replicaten per conditie (n = 3).